

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**Acerca da participação da PKM $\zeta$  na reconsolidação da memória de  
reconhecimento de objetos**

Orientador: Martín Cammarota

Discente: Gênedy Apolinário

Natal

2018

Gênedy Apolinário

**Acerca da participação da PKM $\zeta$  na reconsolidação da memória de  
reconhecimento de objetos**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Neurociências do Instituto do Cérebro  
da Universidade Federal do Rio  
Grande do Norte, como requisito  
parcial para a obtenção do Título de  
Mestre em Neurociências.

**Banca examinadora**

Martín Cammarota – Presidente (UFRN)

Diego Andres Laplagne – Examinador interno (UFRN)

Flávio Freitas Barbosa – Examinador externo (UFPB)

Natal

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Árvore do Conhecimento - Instituto do Cérebro - ICE

Apolinário, Gênedy Karielly da Silva.

Acerca da participação da PKMZ na reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos / Gênedy Karielly da Silva Apolinário.  
- Natal, 2018.

77f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Instituto do Cérebro, Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

Orientador: Martín Cammarota.

1. Memória de reconhecimento de objetos. 2. Reconsolidação de memórias. 3. PKMZ. 4. ZIP. I. Cammarota, Martín. II. Título.

## **Agradecimentos**

Martín, obrigado pelo ambiente de trabalho. Em seu laboratório, além de se ter a sensação de que se há de tudo e que com responsabilidade possa se investigar igualmente de tudo, a atmosfera que paira sobre este é a da verdade. Pode soar brega o que vou falar, mas seus trabalhos com muitos experimentos controles são como joias lapidadas. Agradeço também pelas conversas que, muitas vezes mesmo não diretas para mim, me fizeram perceber que para progredir há de se trabalhar tanto tempo quanto ou mais do que se passa pensando. Obrigado por acreditar no meu esforço e por me receber para o doutorado. Te acho incrível e gosto muito de você.

Lia, eu só tenho muito a te agradecer. Eu nem sei por onde começar a fazer isso... talvez pelo dia que eu falei com você sobre aplicar para sua vaga de mestrado e você me disse “tudo bem, as meninas me falaram que você é um menino responsável” e em seguida me perguntou se eu sabia o que era um engrama. Nesse dia eu gostei de ter sido colocado como responsável, mas gostei mais ainda foi da maneira como você completou minha resposta. Fez isso lembrando-me que os fenômenos devem ser olhados pelas lentes não só da biologia, mas também da física e da química. Não que você tenha me dito isso diretamente, mas foi isso que captei. Nesse dia reconheci em você algo que eu também tinha em mim, algo que eu não encontro sempre por aí e que, lembrei, me encanta. Sei que você só estava sendo você, mas agradeço, pois é agradecido que me sinto por ter encontrado alguém com quem me identifico tanto. Obrigado também por sempre se fazer disponível. A cada encontro com

você teve um reencontro comigo. Suas palavras foram sempre como água e tapas lançados sobre o rosto de quem você não queria ver adormecer. Obrigado por com essas conversas você me proporcionar o acordar que eu precisava para voltar a sentir que não sou folha ao vento. Por tudo isso, percebo que o obrigado que eu dava ao fim de nossas conversas não reflete um terço do reconhecimento que tenho por toda a sua existência em minha vida e que o que sinto por você é amor. Te amo.

Janine, obrigado por ser essa pessoa super profissional. Tenho muito do que me inspirar em você, começando pela dedicação e organização. Obrigado pelas ajudas com os textos, por se dispor a me ensinar sobre os experimentos e por todo o trabalho despendido na produção dessa dissertação. Você é uma mulher incrível. Gosto muito de você.

Caro e Andressa, obrigado por me receberem no laboratório, pelas ajudas com os textos nos momentos de confusão e por me confiarem responsabilidades. Sabia que gostava muito de vocês, mas agora depois de revisitar memórias e organizar os pensamentos gosto de vocês ainda mais. Vocês são pessoas incríveis e profissionais exemplares. Muito obrigado.

Diana, obrigado por sempre se dispor a me ensinar as técnicas que você sabe e também por ser essa pessoa divertida com quem é sempre bom conversar. Sei que há um consenso de que você é bruta, mas a verdade é que eu sinto uma calma quando estou com você. Acho que você é bruta para deixar as coisas em ordem, como as coisas deveriam ser, e isso é muito bom. É ótimo dividir o laboratório com você. Obrigado.

Mãe e irmãs obrigado por sempre estarem comigo mesmo à distância. Vocês são sempre motivos para sorrir e gargalhar, para reconhecer a vida.

Marlon, Chris e Ingrid, obrigado pela irmandade. Vocês são como um órgão meu. Um como o coração. Ligado às emoções. Que se faz sentir e ouvir.

Caio, agradeço a você como quem agradece à sorte. Não por desconhecer que nossa relação seja fruto de troca ou mesmo por não saber que sua companhia traga mais do que qualquer amuleto possa trazer, disso eu sei, mas por sentir que você está sempre torcendo por mim, querendo que eu alcance seja lá qual for o desejo que meu eu autêntico venha a ter. Agradeço-o como quem agradece à sorte, pois é sortudo que me sinto ao seu lado, cujas verdades e poesias têm sido lembretes de que há de se enfrentar os dias e o medo que, hoje sei, talvez só se acumule naqueles que se escondem. Por toda essa sua presença em minha vida, por você se fazer solo fértil para meu amor e por me escolher para sua dança, por meus abraços singulares e por seu humano, mais que te agradeço como quem agradece à sorte, te amo.

Obrigado a CAPES e ao CNPQ pelo financiamento dos meus estudos, pois de outra maneira tudo seria mais difícil.

Por fim, agradeço a UFRN por sempre ter me acolhido e ter sido espaço para meu descobrimento. Sinto-me muito feliz por estar em um local como este, que me faz sentir pertencente.

## Sumário

Lista de abreviaturas .....	8
Resumo .....	12
Abstract .....	14
1 Introdução .....	15
1.1 Motivação .....	15
1.2 Memória .....	16
1.3 Reconsolidação da memória .....	17
1.4 Memória de reconhecimento de objetos .....	17
1.5 Proteína quinase M $\zeta$ (PKM $\zeta$ ) .....	19
2 Objetivos .....	21
2.1 Objetivo geral .....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
3 Materiais e Métodos .....	22
3.1 Sujeitos experimentais .....	22
3.2 Implantes de cânula e multieletrodos .....	22
3.3 Tarefa de reconhecimento de objetos .....	24
3.4 Procedimentos de infusão de drogas .....	26
3.5 Imunoblotting .....	27
3.6 Análises eletrofisiológicas .....	29

3. Resultados.....	31
4. Discussão .....	57
5. Conclusões .....	62
6. Referências.....	63



## **Lista de abreviaturas**

ANI – Anisomicina

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

EC – Córtex entorrinal

CI – Córtex insular

DA – Doença de Alzheimer

LTP – Potenciação de longa duração

MLD – Memória de longa duração

MRO – Memória de reconhecimento de objetos

PKM $\zeta$  – Proteína quinase M zeta

PSD – Densidade pós-sináptica

RO – Reconhecimento de objetos

RON – Reconhecimento de objeto novo

VEH – Veículo

ZIP – Peptídeo inibitório zeta

## Lista de figuras

Figura 1. Desenho esquemático do local de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal de rato .....	23
Figura 2. Desenho esquemático do local de infusão no córtex entorrinal de rato. ....	23
Figura 3. Desenho esquemático do local de implante dos eletrodos na região CA1 do hipocampo dorsal de rato .....	24
Figura 4. Objetos estímulo. ....	25
Figura 5. Tarefa de reconhecimento de objetos .....	26
Figura 6. A reconsolidação da MRO necessita da PKM $\zeta$ no hipocampo dorsal	33
Figura 7. A idade da memória não interfere com o efeito amnésico do ZIP .....	34
Figura 8. O efeito amnésico de ZIP é duradouro.....	35
Figura 9. A inibição da PKM $\zeta$ após reativação na ausência de novidade não afeta a retenção da MRO .....	36
Figura 10. A reativação da MRO é necessária desencadear a sua reconsolidação..	37
Figura 11. A inibição da PKM $\zeta$ hipocampal só apaga a MRO se está for reativada ..	38
Figura 12. A inibição da PKM $\zeta$ não afeta a consolidação da MRO.....	39
Figura 13. A inibição da reativação da MRO impede a amnésia causada pelo bloqueio da PKM $\zeta$ .....	41
Figura 14. A infusão de ZIP não afeta a funcionalidade hipocampal.....	43
Figura 15. A infusão de ZIP não afeta a atividade oscilatória hipocampal nem a ulterior aquisição de memórias dependentes do hipocampo .....	45
Figura 16. ZIP não interfere na autofosforilação da CAMKII .....	46

Figura 17. A reativação da MRO na presença de um objeto familiar e um novo aumenta a expressão de PKM $\zeta$ na região CA1 do hipocampo dorsal.....	48
Figura 18. BDNF reverte o efeito amnésico de ANI mas não de ZIP .....	50
Figura 19. DYN reverte o efeito amnésico de ZIP .....	52
Figura 20. A reativação da MRO na presença de novidade aumenta a quantidade de GluA1 e GluA na PSD .....	53
Figura 21. A consolidação da MRO, mas não sua reconsolidação, necessita de síntese proteica no córtex entorrinal.....	55
Figura 22. A infusão intra hipocampal de ZIP apaga a memória reativada em presença de novidade. ....	56

## Resumo

Recordar fatos e eventos necessita da memória de reconhecimento de objetos (MRO). O processo de reconsolidação integra nova informação na MRO mediante um mecanismo que envolve mudanças na eficácia sináptica hipocampal e na sinalização mediada pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Por sua vez, o BDNF modula positivamente a indução e a manutenção da potenciação de longa duração (LTP) através de um processo que requer a ativação de uma isoforma de PKC atípica denominada proteína quinase M zeta (PKM $\zeta$ ) a qual, acredita-se, é capaz de preservar as memórias ao controlar a funcionalidade dos receptores AMPA (AMPA). No entanto, e apesar desses antecedentes, a possível participação da PKM $\zeta$  na reconsolidação da MRO ainda não tem sido estudada. Utilizando ratos Wistar machos, nós encontramos que a inibição da PKM $\zeta$  hipocampal com o peptídeo inibitório zeta (ZIP) ou com oligonucleotídeos antisentido, mas não o bloqueio da PKC $\alpha/\lambda$  com ICAP, impediu a retenção da MRO, mas só apenas quando esta foi reativada na presença de um objeto desconhecido. Consistente com esses resultados, a reativação da MRO aumentou os níveis de expressão da PKM $\zeta$  hipocampal unicamente quando esta ocorreu em presença de um objeto não familiar. Também encontramos que a coinfusão de BDNF recombinante reverteu à amnésia induzida pela inibição da síntese proteica hipocampal após a reativação da MRO, mas não aquela provocada pelo ZIP, o qual não afetou nem a atividade oscilatória espontânea nem a fosforilação da CaMKII no hipocampo. Mais ainda, observamos que o bloqueio da inserção dos AMPAR

na membrana neuronal prejudicou a retenção da MRO enquanto que a inibição farmacológica da endocitose destes receptores aumentou os níveis de GluA1 e GluA2 associados às PSDs hipocampais e reverteu o efeito amnésico do ZIP. Sabe-se que a consolidação da MRO, mas não sua reconsolidação, requer a indução de síntese de proteínas no córtex entorrinal (CE). Nós encontramos que aqueles animais que se tornaram amnésicos pela administração de ZIP após a reativação da MRO readquiriram esta quando retreinados, mas a inibição da síntese proteica no CE impediu esse reaprendizado, como se a memória em questão tivesse tido que ser consolidada novamente. Nossos resultados demonstram que a PKM $\zeta$  hipocampal atua *downstream* o BDNF para regular a reciclagem dos AMPAR durante a reconsolidação, e indicam que a inibição da PKM $\zeta$  durante esse processo apaga a MRO.

## **Abstract**

Remembering facts and events requires object recognition memory (MRO). Reconsolidation integrates new information into MRO through bidirectional changes in hippocampal synaptic efficacy and BDNF signaling. In turn, BDNF enhances long term potentiation (LTP) through protein kinase M $\zeta$  (PKM $\zeta$ ), which might preserve memory by controlling AMPAR function. However, the possible involvement of PKM $\zeta$  in ORM reconsolidation has not yet been studied. In rats, we found that hippocampal PKM $\zeta$  inhibition with zeta-inhibitory peptide (ZIP) or antisense oligonucleotides, but not PKC $\alpha/\lambda$  inhibition with ICAP, hindered retention provided MRO was reactivated simultaneously with the introduction of a novel object. Similarly, ORM reactivation increased hippocampal PKM $\zeta$  only when it happened in the presence of an unfamiliar object. BDNF co-infusion reversed the amnesia induced by post-reactivation hippocampal protein synthesis inhibition but not that triggered by ZIP, which did not affect neither spontaneous oscillatory activity or CAMKII phosphorylation. Moreover, reduction of hippocampal AMPAR surface expression after MRO reactivation hampered retention, whereas blockade of AMPAR endocytosis increased PSD GluA1/GluA2 and reversed the amnesic effect of ZIP. MRO consolidation, but not reconsolidation, requires protein synthesis in entorhinal cortex (CE). We found that animals rendered amnesic by intra-CA1 ZIP reacquired MRO upon retraining, but inhibition of CE protein synthesis impaired relearning as if MRO had to be consolidated anew. Our results show that hippocampal PKM $\zeta$  acts

downstream BDNF to regulate AMPAR recycling at the time of reconsolidation and indicate that PKM $\zeta$  inhibition during this process deletes MRO.

## **1 Introdução**

### **1.1 Motivação**

Nesta dissertação trato da memória, fenômeno biológico compartilhado por todos os seres capazes de adquirir e reter informações e usá-las em ocasiões futuras. Fenômeno que torna possível a construção da identidade de cada um de nós, a manutenção de culturas através de gerações e também o desenvolvimento da ciência. Trato desse fenômeno com o intuito de identificar e entender os mecanismos biológicos que o tornam possível para, quem sabe, assim, um dia se torne possível o desenvolvimento de meios de manipulá-lo.

A memória pode ser pensada como a resultante de um conjunto de processos que permite a consolidação, persistência, atualização e evocação de um aprendizado (Dudai, 2002). Para não só entendermos a memória, mas como para que também sejamos capazes de manipulá-la, entretanto, faz-se necessário que não só a descrevamos em nível de fenômeno, reconhecendo seus diferentes processamentos, mas que a entendamos também em nível de mecanismo, identificando e compreendendo quais as moléculas e reações que a intermedeiam.

Notório é que a investigação das moléculas e cascatas bioquímicas que intermedeiam os diferentes processos mnemônicos vem nos permitindo vislumbrar o dia em que poderemos interferir em e manipular tais processos. Para chegarmos até esse dia, entretanto, ainda muito esforço tem que ser investido. Afinal, são distintos processos mnemônicos a se estudar e o número de moléculas candidatas a intermediarem esses processos é grande.



É com o intuito de contribuir com o avanço dos estudos da memória que, nesta dissertação, estudo especificamente o processo de atualização (reconsolidação) das memórias de reconhecimento de objetos. Investigando quais são as moléculas e regiões cerebrais que estão envolvidas neste processo.

## **1.2 Memória**

Ao pensar um pouco sobre a memória, torna-se claro que nem todas são iguais; que algumas são referentes a aprendizados motores, enquanto outras dizem respeito as nossas vivências e conhecimentos gerais; que algumas duram apenas o tempo de serem usadas, enquanto outras podem durar por toda uma vida.

Como de comum acontecer com todo fenômeno que se é estudado, as diferentes memórias são descritas e categorizadas em distintos grupos. As que podem ser acessadas de forma consciente e, no caso dos humanos, também verbalizadas, são classificadas como explícitas enquanto as que não podem ser acessadas dessa maneira são ditas implícitas (Bear et al, 2015).

Dentro da categoria das memórias explícitas estão as memórias episódicas, as quais são autobiográficas, contextuais e contam com aspectos cronológicos, espaciais e de reconhecimento (informações sobre quando, onde e o que aconteceu), e as memórias semânticas, que são compostas por conhecimentos gerais, nomes, fatos, significados e conceitos. A categoria das memórias implícitas contém as memórias de habilidades, hábitos e de condicionamentos.

### **1.3 Reconsolidação da memória**

As informações adquiridas através da prática ou experiência necessitam passar por um processo dependente de expressão gênica e de síntese proteica denominado consolidação para serem armazenadas como memórias de longa duração. Esse processo modula a eficácia neuronal e promove o estabelecimento de novas conexões sinápticas assim como o fortalecimento de conexões pré-existentes, convertendo um traço inicialmente frágil e suscetível a agentes amnésicos em uma memória de longa duração estável e persistente (Davis & Squire, 1984; Mcgaugh, 1966).

Quando essas memórias de longa duração são evocadas na ausência de reforço, elas podem voltar a ser lábeis e, para persistirem, devem passar por um novo processo dependente de síntese proteica e expressão gênica denominado reconsolidação. Esse fenômeno implica que as memórias possam ser modificadas ou descartadas no momento de sua reativação, permitindo especular acerca da possibilidade de modulação do traço mnemônico (Misanin et al., 1968; Nader et AL., 2000; Przybyslawski & Sara, 1997).

É importante ressaltar, contudo, que as condições necessárias para a reconsolidação acontecer variam entre os tipos de memórias e ainda não estão bem estabelecidas (Nader & Hardt, 2009).

### **1.4 Memória de reconhecimento de objetos**

O reconhecimento de objetos é um componente chave das memórias declarativas que envolve a avaliação dos atributos sensoriais e espaciais dos

entes e objetos materiais que nos rodeiam, característica que confere a habilidade de discriminar entre aspectos familiares e novos, uma capacidade obviamente significativa no que diz respeito à sobrevivência. De fato, o declínio no processamento da memória de reconhecimento é um dos primeiros sintomas diagnósticos da doença de Alzheimer (DA), o qual está também está associado à disfunção hipocampal severa (Wang et al., 2006; Bush et al., 2007; Fellgiebel et al., 2008) e alterações na sinalização intracelular mediada pelo BDNF (O'Bryant et al., 2009; Wang et al., 2011; Zhang et al., 2012).

A consolidação e a expressão da memória de reconhecimento de objetos (MRO) requerem a participação do hipocampo dorsal (Rossato et al., 2007; DeVito e Eichenbaum, 2010; Cohen e Stackman, 2015), mas a reconsolidação deste tipo de memória recruta o hipocampo só quando a reativação ocorre concomitantemente com a integração de nova informação ao traço mnemônico ativo (Rossato et al., 2007; 2015). Este processo é controlado pelo BDNF (Radiske et al., 2017) e está acompanhado por um breve período inicial de depotenciação da eficácia hipocampal seguido de um estágio tardio de potenciação sináptica (Clarke et al., 2010).

Nesse sentido, o uso de paradigmas comportamentais baseados no reconhecimento de objetos é essencial para entender as bases neurobiológicas da memória declarativa bem como suas desordens patológicas (Winters et al., 2008). Com esse intuito, a tarefa de reconhecimento de objetos é utilizada para avaliar a memória de reconhecimento em roedores, de forma análoga aos testes psicológicos realizados em humanos (Reed & Squire, 1997), sendo esse

teste baseado na atração natural desses animais pela novidade (Ennaceur & Delacour, 1988).

### 1.5 **Proteína quinase M $\zeta$ (PKM $\zeta$ )**

Para persistirem, as memórias de longa duração (MLD) devem superar a rápida reciclagem de seus substratos moleculares. Existem numerosas hipóteses tentando explicar como isso ocorre, as quais variam grandemente tanto no seu enfoque como na quantidade e qualidade da evidência experimental que as sustentam. Dentre estas hipóteses, talvez as mais destacadas pela sua influência histórica na área são aquelas que postulam que o armazenamento duradouro da MLD envolve modificações na metilação (Vanyushin et al., 1974; 1977) ou sequência do DNA (Crick, 1984), na modulação do crescimento sináptico automantido através de processos semelhantes àqueles controlados pelas proteínas priônicas (Bailey et al., 2004), ou na regulação de proteínas catalíticas capazes de perpetuar seu próprio estado de ativação (Fukunaga e Miyamoto, 2000; Lisman and McIntyre, 2001). Mais recentemente, Todd Sacktor e colaboradores (Drier et al., 2002; Shema et al., 2007; Sacktor 2008; 2011; Sacktor and Hell, 2017), da State University of New York nos Estados Unidos, propuseram que a ativação da PKM $\zeta$ , uma isoforma da família das PKCs atípicas expressa exclusivamente no sistema nervoso e particularmente enriquecida no hipocampo (Naiuk et al., 2000; Hernández et al., 2013), é suficiente para determinar a persistência da MLD. Dado que a PKM $\zeta$  é transcrita a partir de um promotor interno do gene da

PKC $\zeta$  para produzir mRNAs que carecem de domínio autoinibitório, esta quinase encontra-se constitutivamente ativa, mas em condições basais sua expressão está reprimida a nível traducional pela sua região 5' não codificante (Hernández et al., 2003, Bal et al., 2016). Este bloqueio traducional da síntese da PMK $\zeta$  pode ser desfeito através da ativação da sinalização intermediada por cálcio e neurotrofinas, o qual, teoricamente, permite à PKM $\zeta$  manter a MLD, potenciando as respostas AMPAérgicas pós-sinápticas (Adasme et al., 2011; Zhang et al., 2012; Ling et al 2006; Mígues et al., 2010; Yao et al., 2013).

Tal como acontece com outras hipóteses acerca das bases moleculares da persistência da memória, a ideia de que a PKM $\zeta$  sustenta a MLD é controversa (Lisman, 2012; 2017; Kwapis e Helmstetter, 2014), tem sido confirmada (Shema et al., 2011; Cai et al., 2011; Tsokas et al., 2016; Wang et al., 2016; Hu et al., 2017) e refutada repetidamente (Wu-Zhang et al., 2012; Lee et al., 2013; Volk et al., 2013), e tem sérias dificuldades para incorporar e explicar o fato de que as memórias não são imutáveis, mas podem ser modificadas para incorporar ou perder informação após sua reativação mediante reconsolidação (Nader e Hardt, 2009). A respeito disso, os poucos trabalhos publicados até o dia de hoje acerca da possível participação da PKM $\zeta$  na reconsolidação de memórias tem produzido resultados contraditórios e, para pior, foram executados utilizando paradigmas comportamentais modelando memórias não declarativas que não permitem distinguir claramente os efeitos gerados pela reconsolidação daqueles produzidos pela extinção de memórias (Crespo et al., 2012; Levitan et al., 2016).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Uma vez que o BDNF facilita a indução da LTP e a metaplasticidade hipocampal através da ativação da PKM $\zeta$  (Mei et al., 2011; Sajikumand e Korte, 2011; Schuette et al., 2016) e pode regular a inserção sináptica dos AMPAR (Caldeira et al., 2007; Li e Wolf, 2011; Jourdi e Kabbaj, 2013; Reimers et al., 2014), o qual parece ser necessário para a reconsolidação de outros tipos de memória (Rao-Ruiz et al., 2011; Bhattachayra et al., 2017), decidimos estabelecer como objetivo central do presente trabalho de dissertação de mestrado investigar a participação da PKM $\zeta$  hipocampal na reconsolidação da MRO e analisar sua possível interação com a sinalização mediada pelo BDNF e a reciclagem dos AMPAR durante esse processo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estudar o efeito da inibição da PKM $\zeta$  na região CA1 do hipocampo dorsal após a reativação da memória de reconhecimento de objetos.
- Analisar a natureza da amnésia induzida pela inibição da PKM $\zeta$  na região CA1 do hipocampo dorsal após a reativação da memória de reconhecimento de objetos, com o intuito de determinar se a mesma é consequência do bloqueio da evocação ou da eliminação do traço mnemônico.
- Estudar o mecanismo pelo qual a PKM $\zeta$  mantém a memória após sua reativação.

### **3 Materiais e Métodos**

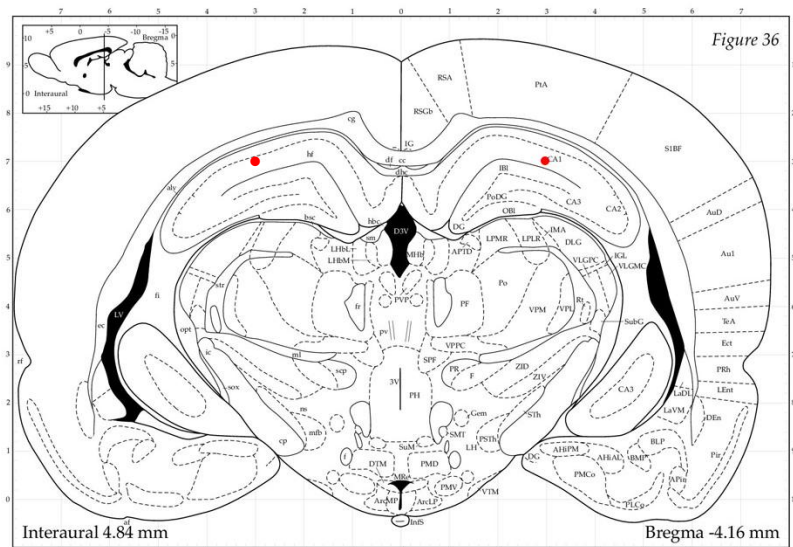
#### **3.1 Sujeitos experimentais**

Nós utilizamos ratos Wistar machos que, ao início dos experimentos, tinham três meses de idade e pesavam entre 300 e 350 g. Estes animais foram mantidos em caixas moradias, cinco por caixa, à temperatura de 23°C, sob um ciclo claro escuro de 12 h e com água e comida *ad libitum*. Os experimentos foram executados durante a fase clara do ciclo, e respeitaram as diretrizes de cuidados aos animais do instituto nacional dos EUA e a comissão de ética no uso de animais (CEUA).

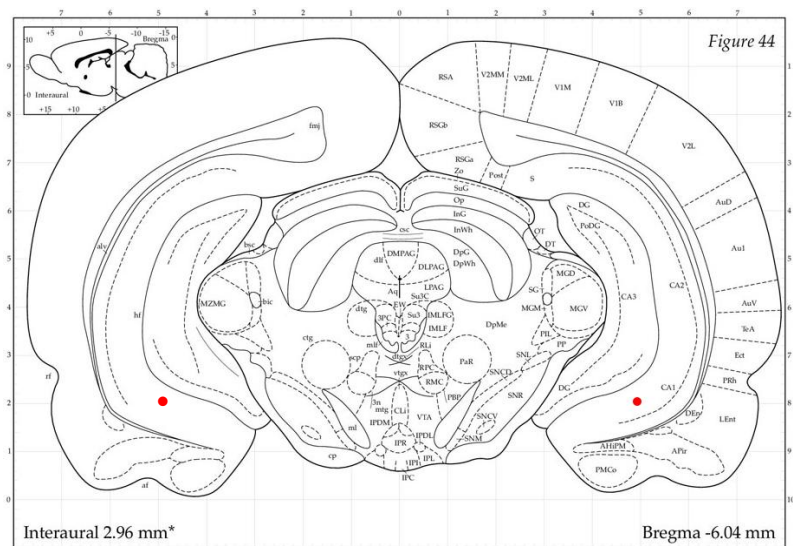
#### **3.2 Implantes de cânula e multieletrodos**

Os ratos foram anestesiados com Quetamina (80 mg/kg) / Xilazina (10 mg/kg) e implantados bilateralmente com cânulas guia de 0,2 mm de calibre direcionadas a região CA1 do hipocampo dorsal (coordenadas estereotáxicas, em mm: anteroposterior, -4,2; laterolateral,  $\pm$  3,0; dorsoventral, -3,0) ou ao córtex entorrinal lateral (coordenadas estereotáxicas, em mm: anteroposterior, -6,8; laterolateral,  $\pm$ 5,0; dorsoventral, -8,1). Alguns desses animais foram também implantados com 16 eletrodos direcionados ao hipocampo dorsal (coordenadas estereotáxicas, em mm: anteroposterior, -3,6, laterolateral, +2,4; dorsoventral, -3,6). Os multieletrodos eram de tungstênio (50  $\mu$ m, revestidos com PFA; da A-M Microsystems) e foram organizados em linhas espaçadas por 250  $\mu$ m. Eletrodos de aterramento foram alocados no osso parietal. Após cirurgia, os ratos receberam meloxicam (0,2 mg/kg) como analgésico. Os

animais implantados com eletrodos foram mantidos em caixas individuais. Os experimentos começaram 7-10 dias após a cirurgia.

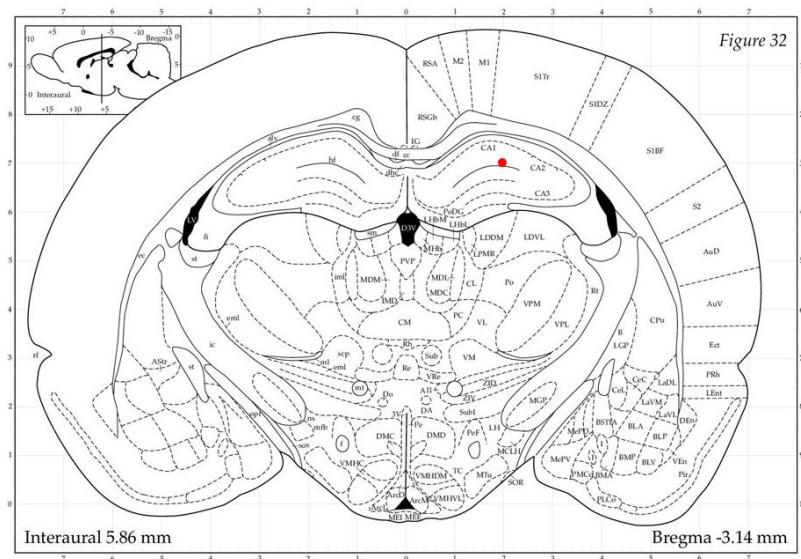


**Figura 1. Desenho esquemático do local de infusão na região CA1 do hipocampo dorsal de rato.** Os pontos vermelhos indicam os locais de infusão (Paxinos et al, 2006).



**Figura 2. Desenho esquemático do local de infusão no córtex entorrinal de rato.** Os pontos vermelhos indicam os locais de infusão (Paxinos et al, 2006).





**Figura 3. Desenho esquemático do local de implante dos eletrodos na região CA1 do hipocampo dorsal de rato. O ponto vermelho indica o local de implante dos eletrodos (Paxinos et al, 2006).**

### 3.3 Tarefa de reconhecimento de objetos

Os animais foram manuseados e habituados à caixa de treinamento (um campo aberto uniforme de 60 cm x 60 cm x 60 cm) ao explorarem esta na ausência dos objetos estímulo por 20min/dia durante quatro dias. Um dia após a última sessão de habituação, os animais foram submetidos a um paradigma de reconhecimento de objetos, o qual se baseia na preferência natural que roedores tem por explorar objetos desconhecidos (Ennaceur e Delacour, 1988; Dix e Aggleton, 1999), como previamente descrito (Rossato et al., 2007; Radiske et al., 2017). Brevemente, animais foram expostos na caixa de treinamento por cinco min (sessão de treinamento) a dois objetos estímulo não familiares (Objetos A e B) feitos de metal, vidro ou cerâmica, e um dia depois foram re-expostos a um dos dois objetos apresentados durante o treino (Objeto A) e a um novo objeto desconhecido (Objeto C) por cinco min (sessão de

reativação). Para avaliar a retenção da MRO, animais foram expostos a um objeto desconhecido D na presença ou do objeto familiar A (Grupo 1), do objeto familiar B (Grupo 2), ou do objeto familiar C (Grupo 3) por cinco minutos (sessão de teste). A retenção da MRO foi avaliada apenas uma vez 3h, 1 dia ou 7 dias após a sessão de reativação. A exploração do objeto foi definida como cheirar ou tatear o objeto estímulo. A análise comportamental foi obtida através do sistema TopScan (CleverSys Inc). O índice de discriminação (DI) foi calculado como:  $(\text{tempo explorando o objeto desconhecido} - \text{Tempo explorando o objeto familiar}) / \text{Tempo total de exploração dos objetos}$ . DI pode variar entre -1 e +1; DI positivo indica preferência pelo objeto desconhecido, enquanto DI próximo a zero significa casualidade (i.e. sem discriminação). Os dados foram analisados usando teste-t de uma amostra com média teórica = 0, teste t de Student não pareado, ou ANOVA de uma ou duas vias seguidas por Bonferroni de múltipla comparação, como apropriado. A significância foi considerada quando  $p < 0,05$ . A análise dos dados foram feitas usando GraphPad Prism 6 software (RRID:SCR\_002798).



**Figura 4. Objetos estímulo.** Foto dos objetos estímulo utilizados na tarefa de reconhecimento de objetos.



**Figura 5. Tarefa de reconhecimento de objetos.**  
Animal sendo treinado na tarefa de reconhecimento de objetos com dois objetos estímulo.

### 3.4 Procedimentos de infusão de drogas

Anisomicina (ANI; 160 µg/lado; Radiske et al., 2017), peptídeo inibitório relacionado a autocamtide-2 (AIP; 5 nmol/side), dynasore (DYN; 120 pmol/side; Macia et al, 2006) e BDNF recombinante humano (0,25 mg/side; Radiske et al., 2017) foram adquiridos da Sigma. Pep2m (5 pmol/lado; Noel et al., 1999; Ralph et al., 2001; Mattison et al., 2014), peptídeo inibitório zeta (ZIP; 1 nmol/lado) e suas versões análogas inativas (Scr-Pep2m; 5 pmol/lado e Scr-ZIP/ 1 nmol/lado) foram compradas da Tocris. PKMζ antisentido (ASO; 5'-CTCTTG GGA AGGCATGA -3'; 2 nmol/lado; Tsokas et al., 2016) e oligonucleotídeos sem sentido (MSO; 5'- AACAAATGGGTCGTCTCG – 3'; 2 nmol/lado; Tsokas et al., 2016?) fosforilado nas três bases terminais para evitar a degradação por nucleases foram comprados da GBToligos. O inibidor da PKCi/λ ICAP (dose; Tsokas et AL., 2016) foi um presente do Dr. Robert V. Farese. As doses das drogas foram selecionadas tendo como base estudos prévios e experimento pilotos. As drogas e os oligonucleotídeos foram dissolvidos após sua chegada

e foram armazenados à temperatura de -20°C em alíquotas protegidas da luz até seu uso. No dia do experimento, alíquotas foram descongeladas a temperatura ambiente e diluídas em salina estéril (pH 7,2; VEH) até as concentrações de trabalho cinco minutos antes das injeções. No momento da administração da droga, nós colocamos as cânulas de infusão nas guias e realizamos a infusão (1 µl/lado; 0,5 µl/min taxa de infusão) usando uma bomba de microinfusão (Harvard Apparatus). Para minimizar o refluxo, as cânulas de infusão permaneceram no local por 1 min adicional antes de serem removidas das guias. A localização das cânulas foi verificada post-mortem. Para isso 2-4 horas após o fim do teste comportamental, MUS fluorescente (1 µl) foi infundido como descrito acima e 30 min depois a marcação foi tida como indicador da difusão da droga previamente injetada. Apenas os dados dos animais com cânulas implantadas corretamente (96%) foram incluídos na análise estatística.

### **3.5 Immunoblotting**

Os animais foram mortos por decapitação em diferentes tempos após a sessão de reativação (30, 90, 180, 360 ou 720 min) e, imediatamente após, a região CA1 do hipocampo dorsal foi dissecada e homogeneizada em buffer de homogeneização gelado (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, containing 0,32 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml aprotinin, 15 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml bacitracin, 10 µg/ml pepstatin, 50 mM NaF, e 1 mM sódio ortovanatado). Frações enriquecidas da PSD foram obtidas como previamente descritas. Brevemente, homogeneizados hipocampais foram centrifugados a

1000xg por 10 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo para um novo ciclo de centrifugação a 10.000 G por 30 min. Este procedimento produziu uma fração membranaar não-PSD (sobrenadante) e um pellet que foi resuspendido em buffer contendo 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% SDS, 5 mM NaF, 1mM EDTA, e 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e centrifugado a 10.000 G por 30 min para obter a fração enriquecida da PSD (sobrenadante). Centrifugações foram realizadas a 4°C. Para determinar a concentração das amostras nós usamos o kit de análise de proteínas BCA (Pierce). SDS/PAGE foi executado sob condições reduzidas e as proteínas foram eletrotransferidas para membranas PVDF (Immobilion-P, Merck Millipore). Os immunoblots foram bloqueados por 2 horas em TTBS (100 mM Tris-HCl, 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) e incubados por toda a noite à temperatura de 4°C com os anticorpos anti-CaMKII (diluição de 1:5.000; coelho policlonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-p-CaMKII (Thr-286; diluição de 1:5.000; cabra policlonal; Santa Cruz Biotechnology), anti-p-CaMKII (Thr-305. Diluição de 1:5.000; coelho policlonal; Sigma), anti- PKM $\zeta$  (diluição de 1:80.000; coelho policlonal; Sigma), anti-GluA1 (diluição de 1:80.000; coelho policlonal; UBI), anti-GluA2/3 (diluição de 1:80.000; coelho policlonal, UBI), ou anti-beta-tubulina (diluição de 1:20.000; coelho policlonal; Abcam). Em seguida, os blots foram lavados com TTBS e incubados com anticorpos HRP-acoplados anti-IgG. O kit de quimiluminescência West-Pico (GE Healthcare) foi usado para detectar imunoreatividade. Os blots foram quantificados com o sistem Amersham Imager 600 RGM (GE Healthcare).

### 3.6 Análises eletrofisiológicas

Nós registramos continuamente o potencial de campo local (LFP) usando o sistema Cerebus Neural Signal Processor (Blackrock Microsystems). Os sinais foram amplificados, digitalizados, filtrados nas entre 0,3 Hz e 250 Hz com taxa de amostragem de 1 kHz. Registros basais foram adquiridos por 30 min antes da infusão da droga. Depois da administração intra-CA1 de veículo (VEH), ZIP ou lidocaína (LID), nós registramos os sinais de LFP durante ~1 h. Nós analisamos os dados off-line usando built-in (Signal Processing Toolbox) e rotinas escritas e customizadas no MATLAB. Para computar o espectro de poder, nós utilizamos o método de periodograma Welch (janelas de Hamming de 5 s, 75% de sobreposição). O poder da banda teta foi definido como a média do poder da frequência entre 4 e 12 Hz. O poder de teta e a raiz média quadrada do LFP (RMS) foram computados usando períodos de 5 min correspondentes ao registro base, 15 min e 60 min depois da infusão da droga. Para construir os espectrogramas, o espectro de poder foi computado usando janelas móveis com intervalos de 4 s e 2 s. Nós analisamos os dados usando ANOVA repetida de duas vias seguida por teste de comparação múltipla de Bonferroni (GraphPad 6 software). A significância foi estabelecida em  $p < 0,05$ . A colocação de cânulas e eletrodos foi verificada post-mortem: após o final dos registros, os animais foram anestesiados e perfundidos intracardiacamente com paraformaldeído 4% (pH 7,2). Imediatamente depois disso, os cérebros foram removidos e deixados em sacarose 30% por 48 h antes de serem

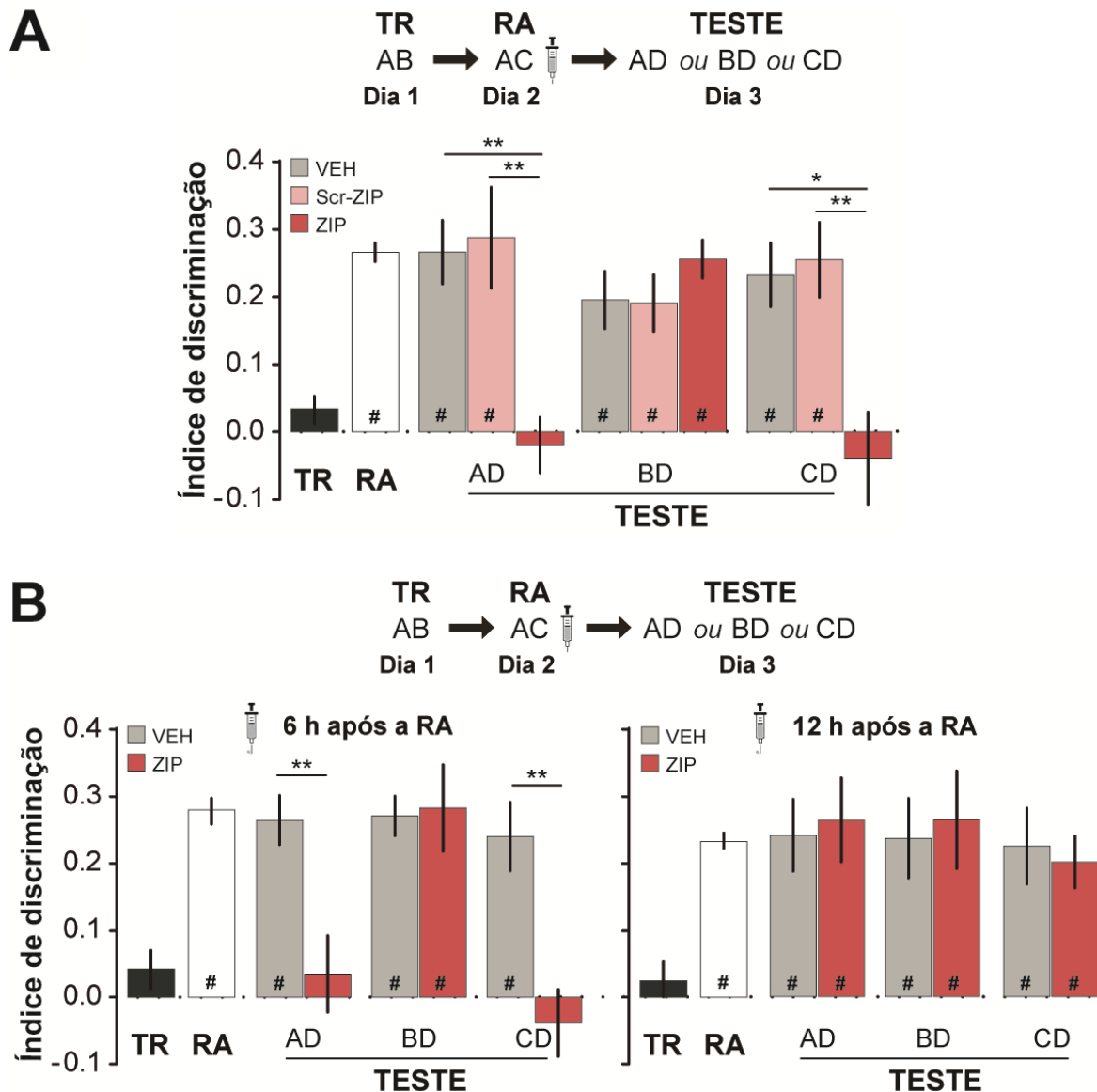
cortados coronalmente em fatias (50  $\mu\text{m}$ ). As fatias relevantes foram coradas com cresil violeta para confirmar a localização das cânulas e eletrodos.

### 3. Resultados

Previamente, nosso laboratório demonstrou que o hipocampo participa da reconsolidação da MRO só quando esta é reativada na presença de um objeto não familiar (Rossato et al., 2007; Myskiw et al., 2008). Portanto, para analisar o efeito da administração intrahipocampal de ZIP na reconsolidação da MRO treinamos ratos na tarefa de aprendizado denominada de reconhecimento de objeto novo (RON) (Ennaucer & Delacour, 1988) utilizando dois objetos diferentes (A e B) como estímulos. Um dia depois, reexpusemos os animais ao objeto A junto com um objeto desconhecido C durante cinco minutos para reativar o traço mnemônico de reconhecimento. Em diferentes tempos após a reativação, os sujeitos experimentais receberam infusões bilaterais de veículo (VEH), ZIP (1 nmol/lado), ou seu análogo inativo (Scr-ZIP 1 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Sendo os grupos VEH e Scr-ZIP controles para observar se a infusão *per se* ou a infusão de um peptídeo qualquer tem algum efeito sobre a retenção da MRO. 24 horas após a infusão, a retenção da MRO foi avaliada. Para fazer isso, distribuímos randomicamente os animais em três grupos experimentais e os deixamos explorar livremente um objeto não familiar D na presença dos objetos conhecidos A, B, ou C. Encontramos que os animais que receberam VEH ou Scr-ZIP imediatamente depois da reativação da MRO discriminaram o objeto novo dos familiares na sessão de teste, indicando que lembravam dos objetos A e B, os quais foram apresentados durante a sessão de treino, e também que tinham adquirido a memória do objeto C durante a sessão de reativação. Pelo contrário, os animais que



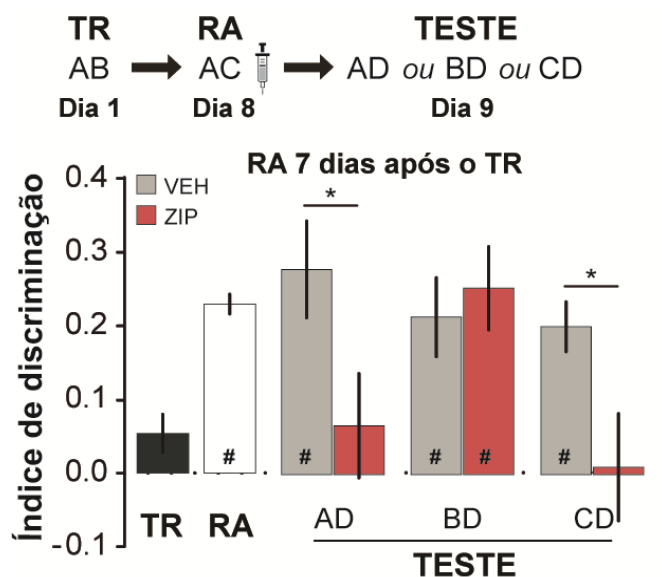
receberam ZIP não discriminaram os objetos familiares A e C do objeto novo D, indicando que ZIP prejudicou a memória do objeto A, o qual foi apresentado pela primeira vez durante o treino, e impediu a retenção da memória do objeto C, o qual foi introduzido durante a sessão de reativação. ZIP não afetou a memória do objeto B, o qual foi apresentado durante a sessão de treino mas não durante a sessão de reativação, sugerindo que inibição da atividade da PKM $\zeta$  não afeta o traço da MRO que não foi reativado (Figura 6A; Teste com objetos AD:  $F_{(2, 30)} = 5,947$ ,  $p = 0,0067$ ; Teste com objetos CD:  $F_{(2, 24)} = 5,991$ ,  $p = 0,0078$ ; Objetos AD VEH vs ZIP:  $t_{(30)} = 2,897$ ,  $p < 0,05$ ; Objetos AD Scr-ZIP vs ZIP:  $t_{(30)} = 3,189$ ,  $p < 0,01$ ; Objetos CD VEH vs ZIP:  $t_{(24)} = 2,784$ ,  $p < 0,05$ ; Objetos CD scrZIP vs ZIP:  $t_{(24)} = 3,033$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni). Para investigar se a ação amnésica de ZIP está limitada dentro de uma janela temporal, administramos VEH ou ZIP (1 nmol/lado) 6 ou 12 horas após a sessão de reativação da MRO. Observamos que ZIP também prejudicou a memória dos objetos A e C quando administrado 6 horas, mas não 12 horas, depois da reativação (Figura 6B; Teste com objetos AD: VEH vs ZIP  $t_{(18)} = 2,707$ ,  $p = 0,0144$ ; Objetos CD VEH vs ZIP:  $t_{(16)} = 2,946$ ,  $p = 0,0095$ , teste t de *Student* não pareado).



**Figura 6. A reconsolidação da MRO necessita da PKM $\zeta$  no hipocampo dorsal. A)** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 horas após o treino foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO de 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH), ZIP ou seu análogo inativo (Scr-ZIP) e um dia mais tarde foram expostos a um objeto familiar (A, B ou C) e a um objeto novo (D) por mais cinco minutos para avaliarmos a retenção da MRO. **B)** Os animais foram treinados como na figura A, com a exceção de terem recebido a infusão 6 horas ou 12 horas após a sessão de reativação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. #  $p < 0.05$  em teste-*t* de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em teste-*t* de Student ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 8-10$  por grupo.

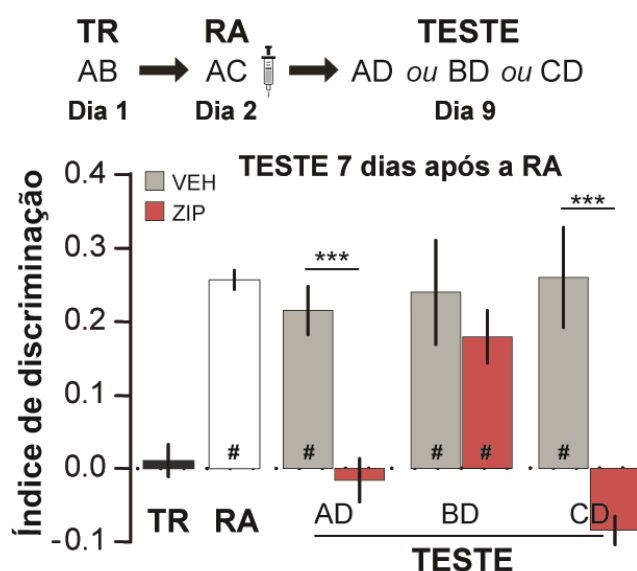
Sabe-se que a idade da memória pode interferir na sua suscetibilidade à reconsolidação (Alberini e LeDoux, 2013). Decidimos investigar se o tempo

transcorrido entre o treino e a sessão de reativação da MRO influencia na amnésia causada pela inibição da PKM $\zeta$ . Para isso, treinamos os animais na tarefa de RO na presença de dois objetos diferentes (A e B) por 5 minutos e 168 horas mais tarde a memória foi reativada na presença de um objeto conhecido (objeto A) e um outro desconhecido (objeto C). Imediatamente após essa sessão os animais receberam infusões bilaterais de VEH ou ZIP (1 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal e, 24 horas depois, a retenção da MRO foi avaliada na presença de um objeto conhecido (objeto A) e um outro desconhecido (objeto D). Observamos que o tempo transcorrido entre a sessão de treino e a sessão de reativação não teve nenhum efeito na amnésia provocada pelo ZIP (Figura 7; Teste: VEH vs ZIP  $t_{(19)} = 2,338$ ,  $p = 0,0305$ ; teste *t* de *Student* não pareado), sugerindo que independente da sua idade, a MRO requer a participação da PKM $\zeta$  hipocampal para persistir após sua reativação.



**Figura 7. A idade da memória não interfere com o efeito amnésico do ZIP.** Ratos foram treinados usando dois objetos diferentes (A e B) e 168 horas depois foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de VEH ou ZIP e um dia mais tarde foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) para avaliarmos a retenção da MRO. Os dados (média  $\pm$  SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste-*t* de *Student* de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em teste-*t* de *Student* ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 8-9$  por grupo.

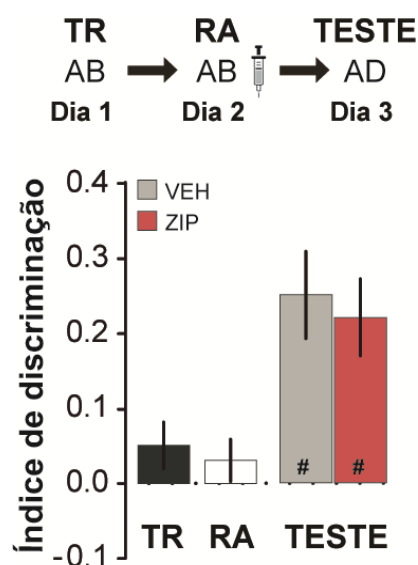
Para investigar se o efeito amnésico causado pela administração de ZIP após a reativação da MRO é persistente, animais treinados na tarefa de RO receberam VEH ou ZIP na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após a sessão de reativação. A retenção da MRO foi avaliada horas mais tarde. Observamos que o tempo transcorrido entre a sessão de reativação e a sessão de retenção da MRO não interferiu na ação amnésica de ZIP (Figura 8 Teste: VEH vs ZIP:  $t_{(14)} = 3,985$ ,  $p = 0,0014$ , teste t de *Student* não pareado), indicando que o efeito amnésico provocado pelo ZIP é duradouro.



**Figura 8. O efeito amnésico de ZIP é duradouro.** Ratos foram treinados usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 h depois foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1 µl/lado) de VEH ou ZIP e 168 h mais tarde foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) para avaliarmos a retenção da MRO. Os dados (média ± SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste-t de *Student* de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em teste-t de *Student* ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 8-9$  por grupo.

Para investigar se a PKM $\zeta$  hipocampal participa da reconsolidação da MRO só quando esta é reativada na presença de novidade, nós treinamos animais na tarefa de reconhecimento de objetos e 24 horas mais tarde reexpusemos esses animais a uma sessão de reativação na presença dos mesmos objetos apresentados no dia do treino (A e B). Imediatamente após a sessão de

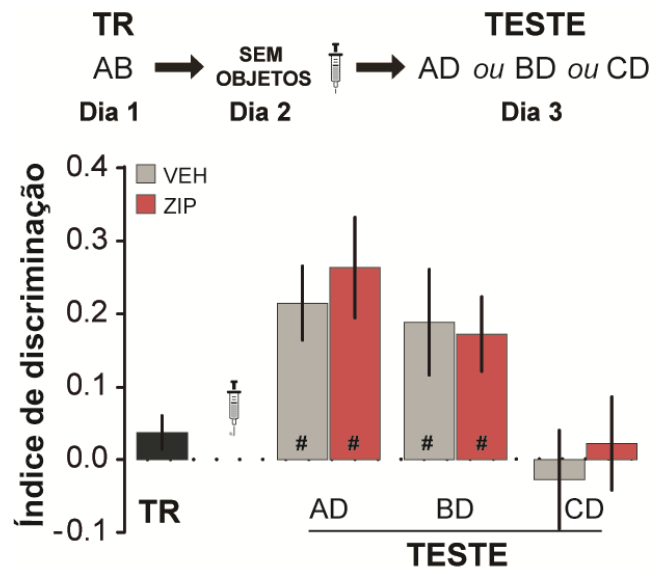
reativação, os animais receberam infusões bilaterais de VEH ou ZIP (1 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal e um dia depois a retenção da memória foi avaliada. A infusão de ZIP não afetou a MRO (Figura 9), sugerindo que a participação da PKM $\zeta$  na reconsolidação da MRO só acontece quando esta é reativada na presença de novidade.



**Figura 9. A inibição da PKM $\zeta$  após reativação na ausência de novidade não afeta a retenção da MRO.** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 horas após o treino foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO de 5 min na presença dos mesmos objetos. Imediatamente, após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou ZIP e um dia mais tarde foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) por mais cinco minutos para avaliarmos a retenção da MRO. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. <sup>#</sup>p < 0.05 em teste-t de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 ou \*p < 0.05 em teste-t de Student ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni; n = 8-9 por grupo.

Para confirmar que a reativação da MRO é necessária desencadear a reconsolidação da mesma, e assim sua susceptibilidade ao ZIP, nós treinamos animais na tarefa de reconhecimento de objetos e um dia mais tarde os colocamos a explorar por 5 minutos a caixa de treinamento em ausência de objetos. Imediatamente ao fim dessa sessão, injetamos bilateralmente VEH ou ZIP (1 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal e 24 horas avaliamos a retenção da memória. Observamos que o ZIP não afetou a memória do objeto A quando injetado depois da exploração da arena de treino na ausência de

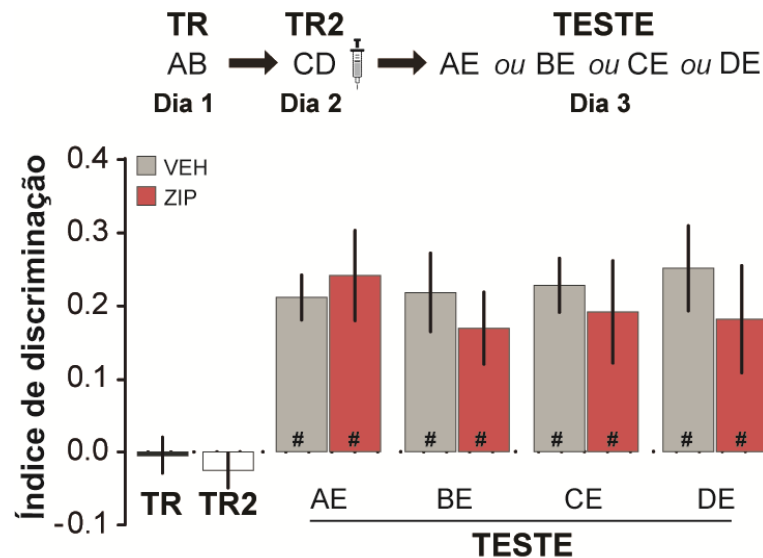
objetos (Figura 10), indicando que a MRO tem que ser reativada para que sua reconsolidação aconteça.



**Figura 10. A reativação da MRO é necessária para desencadear a sua reconsolidação.** Ratos foram tratados como descrito acima exceto que a reativação foi realizada na ausência de objetos. Um dia mais tarde foram expostos aos objetos A-D, B-D ou C-D para avaliarmos a retenção da MRO. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. <sup>#</sup>p < 0.05 NS em teste-t de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 ou \*p < 0.05 em teste-t de Student ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni; n = 8-9 por grupo.

Para confirmar que a reativação da MRO é necessária para que a inibição da PKMζ hipocampal resulte em amnésia, os animais foram treinados na tarefa de RO com dois objetos diferentes (A e B) e 24 horas mais tarde foram re-expostos a outros dois objetos diferentes desconhecidos (C e D). Imediatamente após a exploração dos objetos C e D, os animais receberam infusões bilaterais de VEH ou ZIP (1 nmol/lado) no hipocampo dorsal. Um dia mais tarde, a retenção da memória foi avaliada. Observamos que o ZIP não

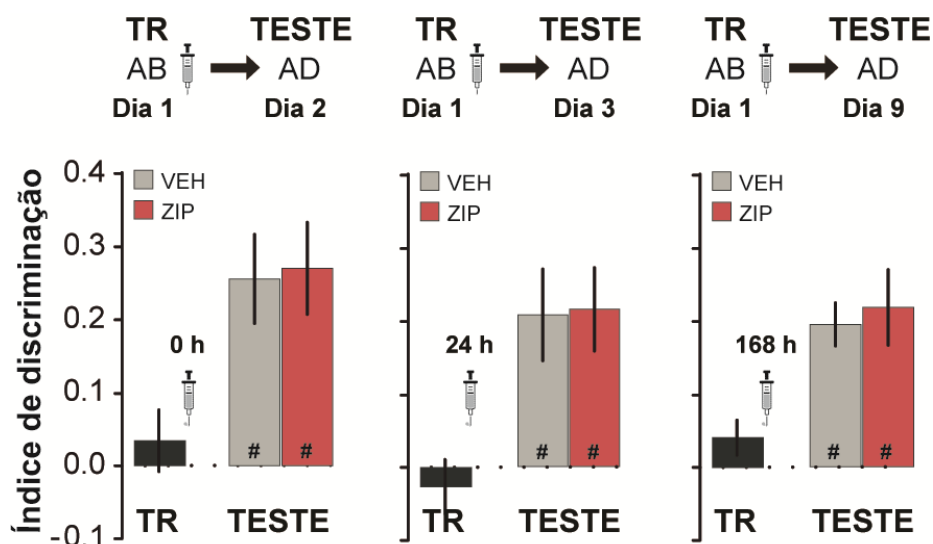
afetou a memória de nenhum dos objetos conhecidos (objetos A e B apresentados na sessão de treino inicial, objetos C e D apresentado na segunda sessão de exploração), indicando que a inibição da PKM $\zeta$  hipocampal só apaga a MRO se está for reativada (Figura 11).



**Figura 11. A inibição da PKM $\zeta$  hipocampal só apaga a MRO se está memória for reativada.** Ratos foram tratados como descrito acima exceto que a reativação foi realizada em presença de dois objetos novos (C e D), 24 h depois os animais foram submetidos a uma sessão de teste em presença de um objeto familiar (A, B, C ou D) e um objeto novo (E) para avaliarmos a retenção da MRO. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste-*t* de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  NS em teste-*t* de Student ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 8-10$  por grupo.

Investigamos também se a inibição da PKM $\zeta$  após o treino tem algum efeito sobre a retenção da MRO. Para isso, os ratos foram treinados na tarefa de reconhecimento de objetos usando dois objetos desconhecidos diferentes (A e B) e, imediatamente, 24 ou 168 horas mais tarde receberam infusões bilaterais de VEH ou ZIP (1 nmol/lado) na região CA1 do hipocampo dorsal. Um dia após

a infusão, a retenção da MRO foi avaliada. Observamos que o ZIP não afetou a memória do objeto A quando administrado imediatamente, 24 ou 168 horas após o treino na ausência de estímulos contextuais específicos (Figura 12), sugerindo que a inibição da PKM $\zeta$  não afeta a consolidação da MRO.



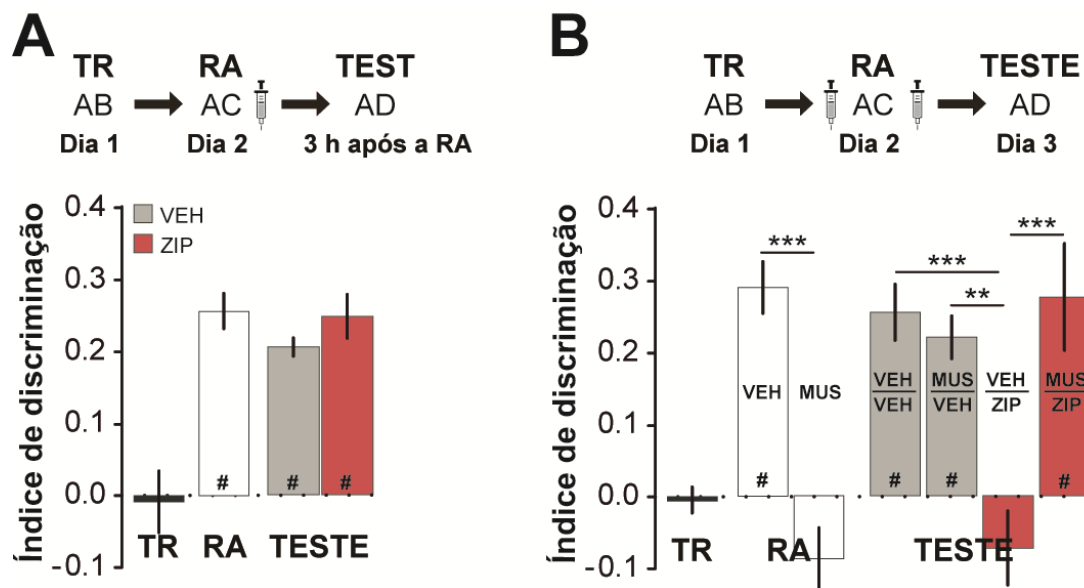
**Figura 12. A inibição da PKM $\zeta$  não afeta a consolidação da MRO.** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e, imediatamente, 24 ou 168 h mais tarde receberam infusões intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de VEH ou ZIP. Um dia após a infusão, os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) por mais 5 min para avaliarmos a retenção da MRO. Os dados (média  $\pm$  SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste- $t$  de *Student* de uma amostragem com média teórica = 0. NS em teste- $t$  de *Student*;  $n = 8-9$  por grupo.

Em outra série de experimentos, os animais foram treinados na tarefa de RO e reexpostos a um objeto familiar (A) junto com um objeto desconhecido (C) para reativar a MRO. Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais de VEH ou ZIP (1 nmol/lado) e 3 horas mais tarde foram testados numa sessão de retenção da MRO. Nós observamos que a administração intrahipocampal de ZIP imediatamente após a reativação na



presença de um objeto novo não afetou a retenção da MRO (Figura 13A), demonstrando que a amnésia causada pela inibição da PKM $\zeta$  não é imediata, mas consequência de um processo ativo que leva tempo para ocorrer.

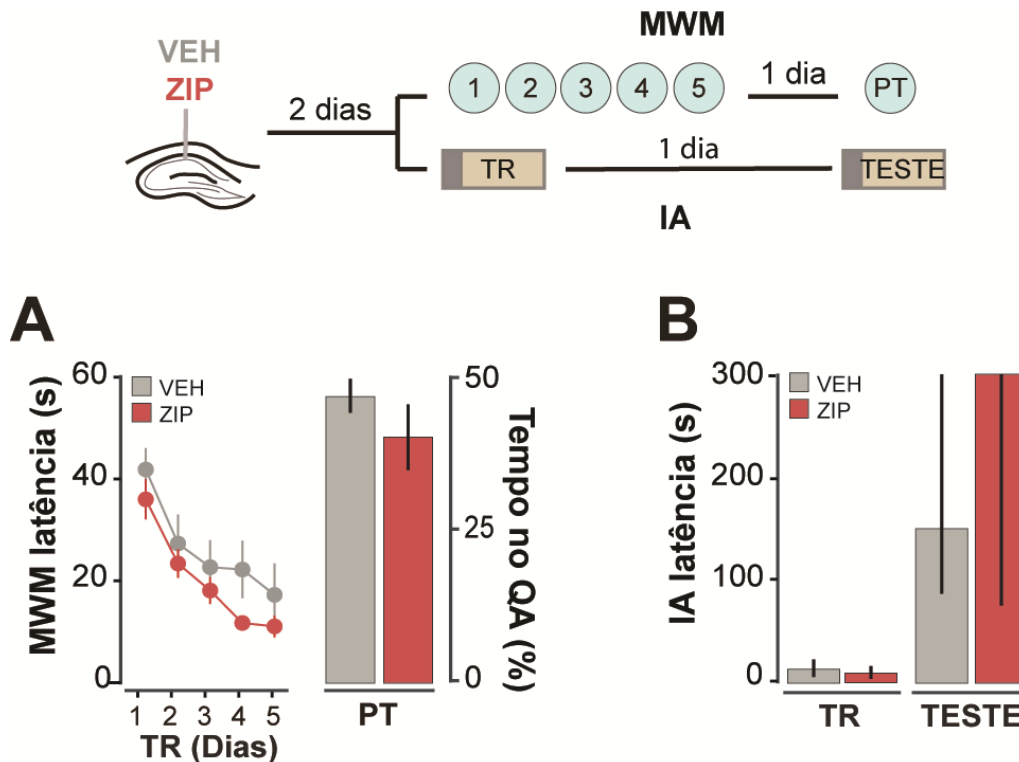
Para confirmar que a amnésia causada pela inibição da PKM $\zeta$  hipocampal só acontece quando a MRO é reativada, infundimos bilateralmente na região CA1 do hipocampo dorsal VEH ou muscimol (MUS 0,1mg/ $\mu$ l) 20 minutos antes da sessão de reativação para impedir a evocação da memória, e imediatamente ao termino da sessão de reativação infundimos VEH ou ZIP (1nmol/lado) nessa mesma região cerebral. Nós observamos que a infusão intrahipocampal de muscimol (0,1mg/ $\mu$ l) antes da sessão de reativação impediu tanto a expressão da MRO como o efeito amnésico do ZIP (Figura 13B; Sessão de reativação com objetos AC:  $t(57) = 4,384$ ,  $p = 0,0001$ , teste t de *Student*. Sessão de teste com objetos AD efeito da interação:  $F(1, 63) = 6,192$ ,  $p = 0,00156$ ; VEH-VEH vs VEH-ZIP:  $t(61) = 3,303$ ,  $p < 0,01$ ; VEH-ZIP vs MUS-ZIP:  $t(61) = 2,904$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni).



**Figura 13. A inibição da reativação da MRO impede a amnésia causada pelo bloqueio da PKM $\zeta$ .** **A)** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 h após o treino foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO de 5 min na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de veículo (VEH) ou ZIP e 3 h mais tarde foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) por mais 5 min para avaliarmos a retenção da MRO. **B)** Os ratos foram tratados como na figura A, com a exceção de terem recebido infusões intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de VEH ou muscimol (MUS) 20 min antes da sessão de reativação e infusões intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de VEH ou ZIP imediatamente ao fim da reativação. Um dia mais tarde foram expostos a um objeto familiar (A, B ou C) e a um objeto novo (D) por mais 5 min para avaliarmos a retenção da MRO. Os dados (média  $\pm$  SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste- $t$  de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em teste- $t$  de Student ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 7-10$  por grupo.

Existe controvérsia acerca de se os efeitos amnésicos de ZIP previamente reportados se devem mesmo a inibição da PKM $\zeta$  ou a mecanismos não específicos de ação (Lisman et al., 2012). Por exemplo, sabe-se que camundongos nocaute para a PKM $\zeta$  são capazes de formar memórias sensíveis à ação do ZIP (Volk et al., 2013; Lee et al., 2013), o qual também é capaz de induzir morte celular e convulsões e reduzir a atividade oscilatória hipocampal em ratos anestesiados quando usado em concentrações 10 vezes maiores, ou mais, do que as utilizadas em nossos experimentos (LeBlancq et

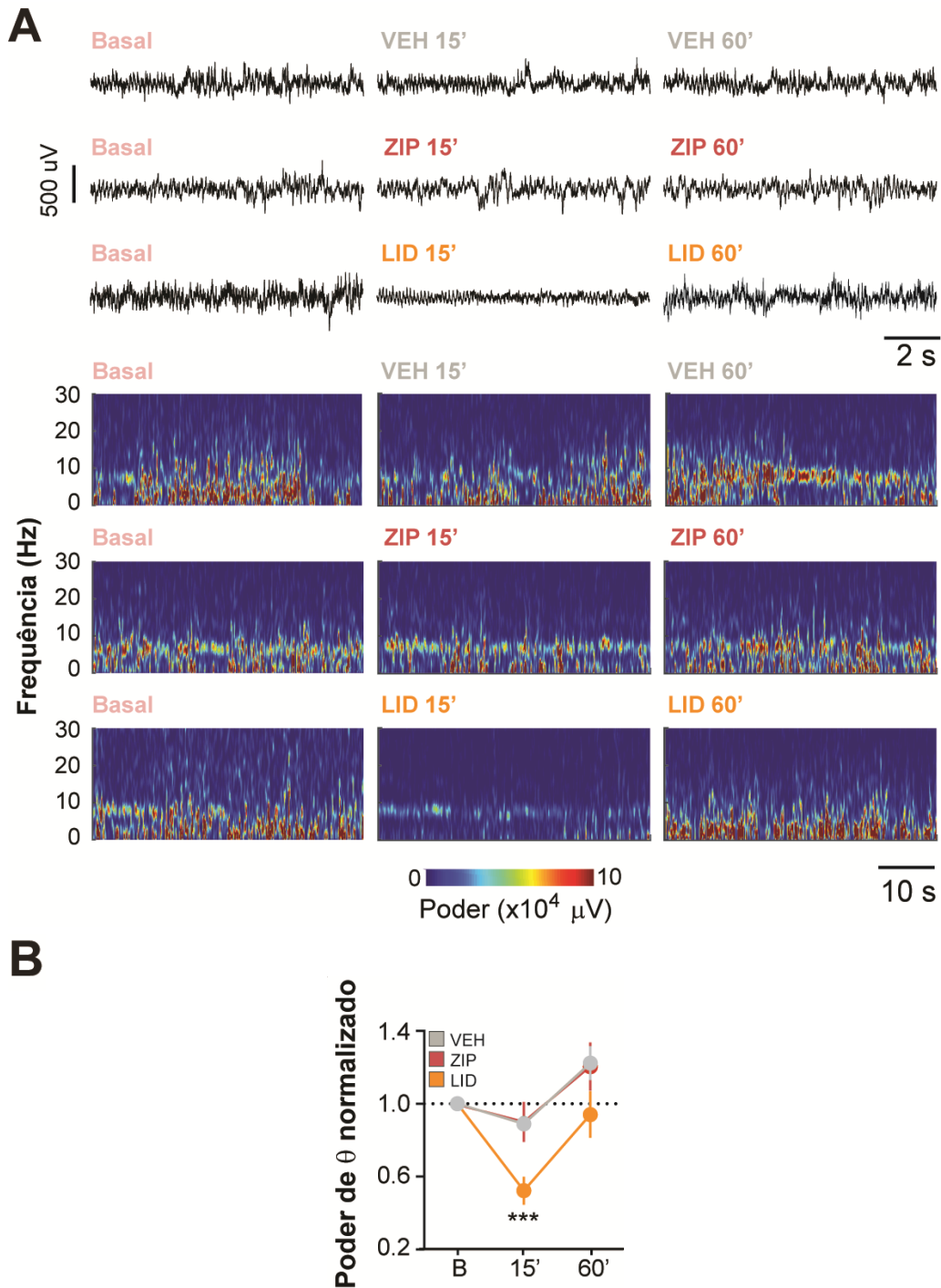
al., 2016 Quando empregado em altas concentrações ZIP pode também inibir a CaMKII (Pastalkova et al., 2006; Lisman, 2012) bem como a PKC $\alpha$ /lambda (Ren et al., 2013; Jail et al., 2015), a qual é capaz de compensar a falta de PKM $\zeta$  durante o armazenamento de memórias em camundongos mutantes que não expressam esta quinase (Tsokas et al., 2016). Nós não observamos a ocorrência de convulsões após a administração de ZIP. Este também não afetou a funcionalidade hipocampal, como demonstrado pelo fato de que seu efeito amnésico resultou ser tempo-dependente e específico para o objeto familiar reapresentado durante a sessão de reativação. Ainda mais, os animais que se mostraram amnésicos para a MRO após receberem ZIP foram mais tarde capazes de adquirir e expressar uma preferência espacial aprendida no labirinto aquático de Morris (Figura 14A) bem como uma resposta de evitamento inibitório na caixa de esquiva condicionada (Figura 14B), as quais requerem do normal funcionamento do hipocampo dorsal (Bures et al. 1997; De Hoz et al. 2004; Redish and Touretzky 1998; Mineka, 1979; Overmier and Brackbill, 1977; Riccio and Silvestri, 1973; Schimanski and Nguyen 2004).



**Figura 14. A infusão de ZIP não afeta a funcionalidade hipocampal. A)** A infusão de ZIP 48 h antes do treino não afeta a aquisição ou retenção da memória espacial dependente do hipocampo. Painel esquerdo: média da latência de escape durante o treino no labirinto aquático de Morris (8 tentativas por dia/5 dias) para os animais que receberam infusões intra-CA1 de veículo (VEH) ou ZIP (1nmol/lado) 48 h antes da primeira sessão de treino, painel reduzido: tempo despendido no quadrante alvo (QA em porcentagem) durante um teste de retenção de 60 s realizado 24 h depois da última sessão de treino; os dados são expressos como média  $\pm$  SEM;  $n = 8$  por grupo. **B)** Mediana da latência de descida da plataforma na tarefa de Esquiva Inibitória para os animais que receberam infusões intra-CA1 de veículo (VEH) ou ZIP (1nmol/lado) 48 h antes da sessão de treino. Os dados são expressos como mediana  $\pm$  variação do interquartil;  $n = 8$  por grupo.

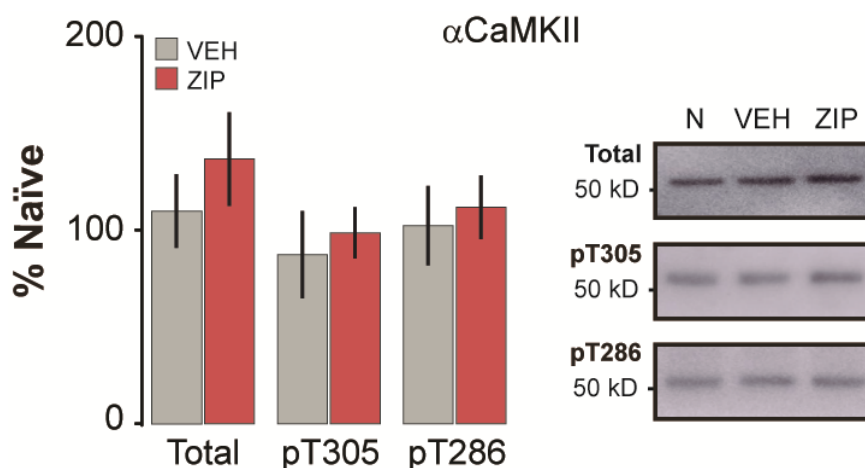
A análise da atividade oscilatória espontânea do hipocampo de ratos acordados que receberam VEH, ZIP (1nmol/lado) ou lidocaína (4%; LID) mostrou que esta última alterou o potencial de campo local (LFP) 15 min depois de sua administração, mas diferente do previamente reportado para animais anestesiados (LeBlancq et al., 2016), o ZIP não alterou nem o LFP nem o poder de teta hipocampal (Figura 15B;  $F_{(2, 18)} = 12,31$ ,  $p < 0,0004$  para efeito de

tempo;  $F_{(2, 9)} = 0,4703$ ,  $p = 0,6393$  para efeito da droga;  $F_{(4, 18)} = 3,494$ ,  $p = 0,0280$  para interação; VEH:  $t_{(18)} = 2,085$ ,  $p > 0,05$  para 15 min vs linha de base. LID:  $t_{(18)} = 1,860$ ,  $p > 0,05$  para 15 min vs 60 min;  $t_{(18)} = 0,2246$ ,  $p > 0,05$  para 60 min vs linha de base. ZIP:  $t_{(18)} = 0,2944$ ,  $p > 0,05$  para 15 min vs linha de base;  $t_{(18)} = 1,298$  e  $p > 0,05$  para 15 min VS 60 min;  $t_{(18)} = 1,003$  e  $p > 0,05$  para 60 min vs linha de base. LID:  $t_{(18)} = 5,484$   $p < 0,001$  por 15 min vs linha de base;  $t_{(18)} = 3,776$ ,  $p < 0,001$  para 15 min vs 60 min;  $t_{(18)} = 1,9708$ ,  $p > 0,05$  para 60 min vs linha de base).



**Figura 15. A infusão de ZIP não afeta a atividade oscilatória hipocampal nem a ulterior aquisição de memórias dependentes do hipocampo. A)** A infusão hipocampal de ZIP não reduz a atividade oscilatória espontânea local. Registros representativos do LFP e espectrogramas de animais que receberam infusões intra-CA1 de VEH, ZIP ou lidocaína (Lido 4%). Os níveis basais são mostrados no painel esquerdo, os níveis 15 min pós-infusão são mostrados ao centro, e os níveis 60 min pós-infusão são mostrados a direita. **B)** Valores normalizados do poder de teta hipocampal de animais que receberam infusões intra-CA1 de VEH, ZIP ou Lido. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM;  $n = 4$  por grupo. Diferentes pontos no tempo (basal, 15 e 60 min pós-infusão) são mostrados.

Immunoblots realizados com homogenatos totais preparados a partir da região CA1 do hipocampo dorsal mostraram que a administração de ZIP não reduziram a autofosforilação dessa quinase em Thr-286 e Thr-305/6 (Figura 16). Indicando que o efeito amnésico do ZIP não é mediado pela CaMKII.

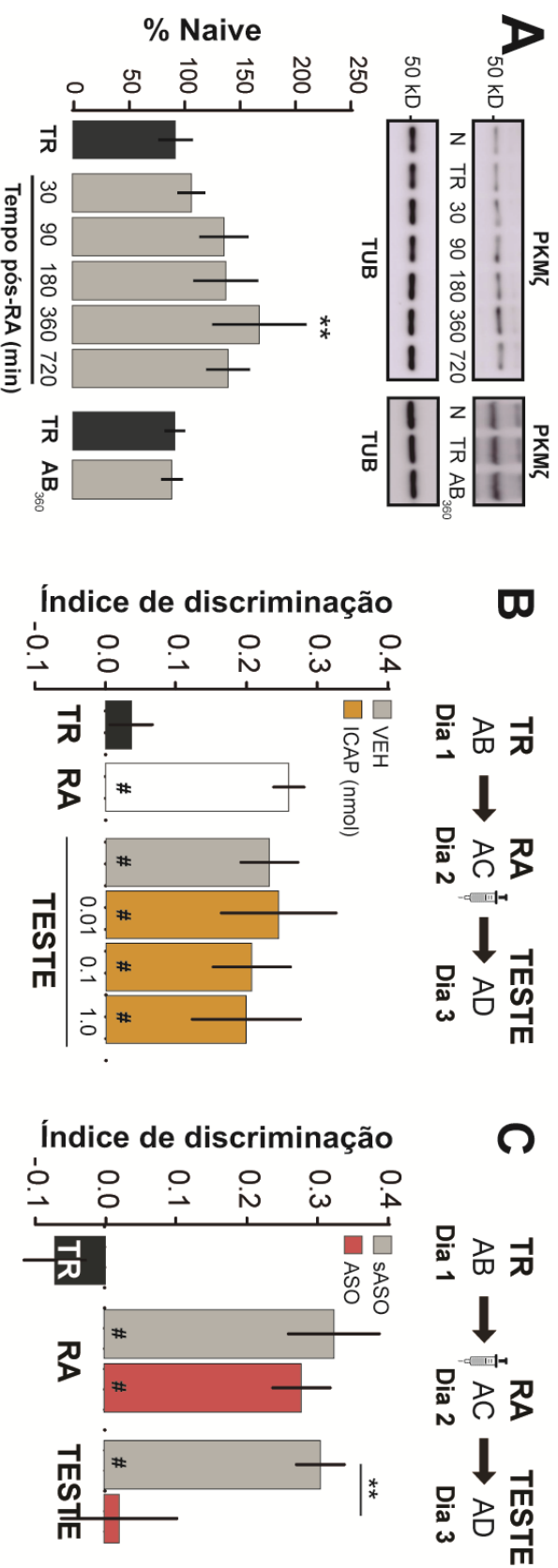


**Figura 16. ZIP não afeta os níveis de fosforilação da CaMKII.** Os animais receberam infusões intra-CA1 de VEH ou ZIP e 30 min após foram sacrificados e a região CA1 do hipocampo dorsal dissecada e homogeneizada para determinação dos níveis de fosforilação da CaMKII em Thr305 e Thr286 por immunoblotting.

Também encontramos que a infusão intra-CA1 do inibidor específico da PKC $\alpha$ /λ ICAP (0,01-1  $\eta$ mol/lado; Tsokas et al., 2016) imediatamente após a reativação da MRO não afetou sua retenção 24 horas mais tarde, sugerindo que o efeito amnésico do ZIP que nós observamos não foi mediado pela PKC $\alpha$ /λ, mas sim pela PKM $\zeta$  (Figura 17B). Esta asseveração está também suportada por achados mostrando que a reativação da MRO na presença de um objeto novo, mas não na presença de dois objetos conhecidos, incrementou a expressão da PKM $\zeta$  na região CA1 do hipocampo dorsal (Figura 17A; painel esquerdo:  $F_{(6, 18)}$

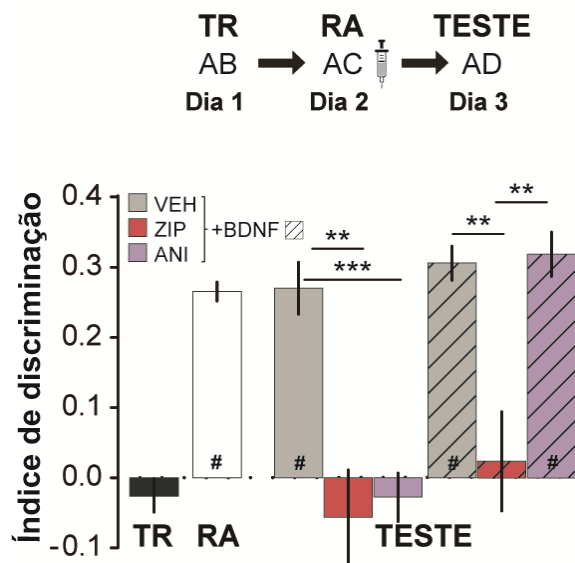
= 5,625,  $p = 0,0019$ ; TRA vs RA360  $t_{(18)} = 4,436$ ,  $p < 0,01$ ; painel direito: TRA vs RA360  $t_{(18)} = 3,110$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de múltiplas comparações de Bonferroni) e que a redução da expressão desta quinase mediante a infusão de oligonucleotídeos antisentido (ASO; 2 nmol/lado) antes da reativação não afetou a evocação, mas impediu a persistência da MRO. A administração na região CA1 do hipocampo dorsal de oligonucleotídeos sem sentido (MSO) baseados na sequência nucleotídica do mRNA da PKM $\zeta$  não teve nenhum efeito mnésico (Figura 17C; Sessão de teste com objetos AD: MSO vs ASO  $t(20) = 2,844$ ,  $p = 0,01$ , teste t de *Student* não pareado).





**Figura 17. A reativação da MRO na presença de um objeto familiar e um novo aumenta a expressão de PKMζ na região CA1 do hipocampo dorsal.** **A)** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 h pós-treino foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) ou dois objetos conhecidos (A e B). Em diferentes tempos (30-720 min) após a reativação, os animais foram sacrificados e a região CA1 do hipocampo dorsal dissecada e homogeneizada para determinação de PKMζ por imunoblotting. N: animais naive. TR: animais treinados na tarefa do RON. RA: sessão de reativação. Os dados são apresentados como média ± SEM. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 4$  por grupo. **B)** Ratos foram treinados na tarefa de RON com dois objetos diferentes (A e B) e 24 h mais tarde foram reativados na presença de um objeto familiar (A) e um objeto desconhecido (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 de VEH ou do inibidor da PKCα (ICAP; 0.01 – 1 nmol). Um dia depois a retenção da memória foi avaliada em uma sessão de teste com um objeto familiar (A) e um objeto novo (D). **C)** Os animais foram tratados com na Figura B, exceto que receberam infusões bilaterais intra-CA1 de oligonucleotídeos antisentido para o mRNA da PKMζ (ASO) ou oligonucleotídeos sem sentido (sASO) 20 min antes da reativação. A retenção da memória foi avaliada 24 h mais tarde em uma sessão de teste com um objeto familiar (A) e um objeto novo (D). Os dados (média ± SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste-*t* de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em teste-*t* de Student ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 7-11$  por grupo.

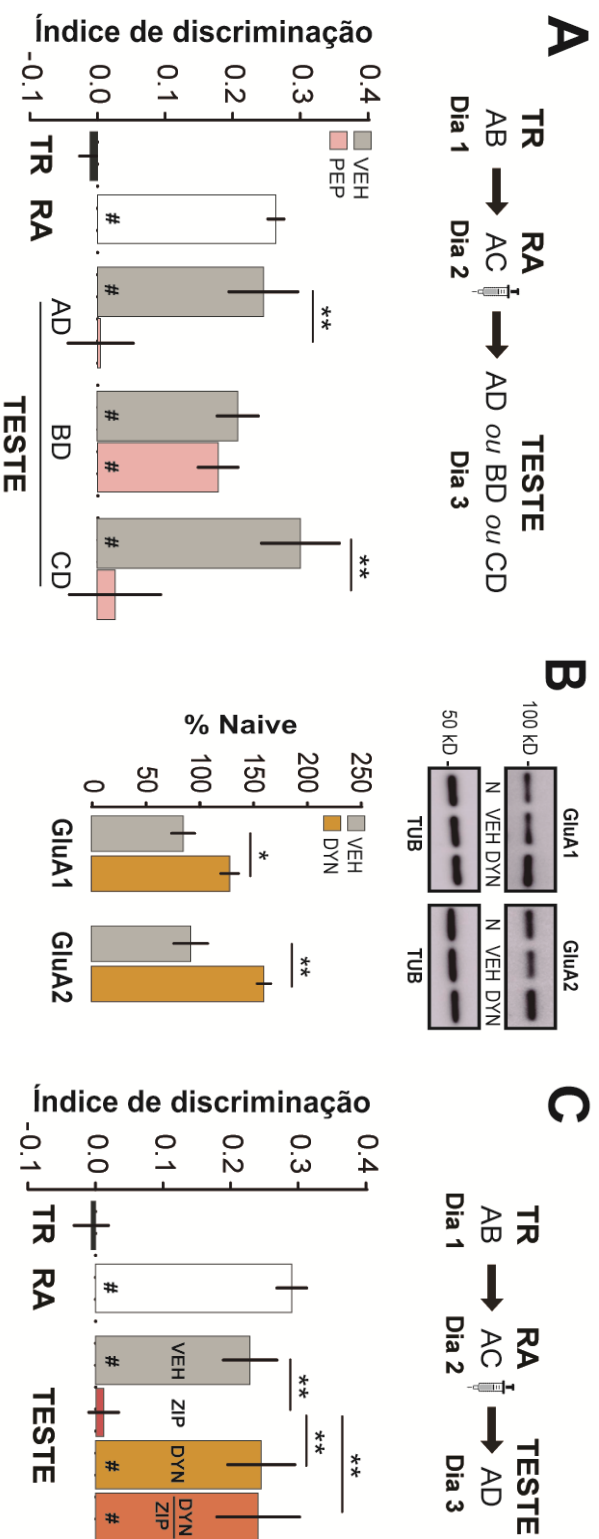
O BDNF modula o *turnover* da PKM $\zeta$  (Kelly et al., 2007) para manter a LTP hipocampal ainda quando a síntese proteica tem sido inibida (Mei et al., 2011). Nosso grupo mostrou previamente que a reconsolidação da MRO está acompanhada pela indução de LTP hipocampal (Clarke et al., 2010), e que o BDNF regula a reconsolidação desse tipo de memória e resgata o traço de reconhecimento reconsolidado da amnésia produzida pela ação de inibidores de síntese de proteínas (Radiske et al., 2017). Devido a isso, nós postulamos que o BDNF também controla a funcionalidade da PKM $\zeta$  nessa preparação. Em concordância com esta hipótese, encontramos que a coinfusão de BDNF recombinante reverteu a amnésia provocada pela administração intrahipocampal do inibidor da síntese proteica anisomicina (ANI; 160  $\mu$ g/lado) imediatamente após a reativação da MRO na presença de um objeto desconhecido, como já descrito (Radiske et al., 2017), mas não afetou a amnésia causada pelo ZIP (Figura 18;  $F_{(5, 50)} = 11,29$ ,  $p < 0,0001$ ; VEH vs ANI  $t_{(50)} = 4,717$ ,  $p < 0,001$ ; VEH vs ZIP  $t_{(50)} = 4,282$ ,  $p < 0,01$ ; VEH vs BDNF-ZIP  $t_{(50)} = 3,398$ ,  $p < 0,05$ ; ANI vs BDNF-VEH  $t_{(50)} = 4,798$ ,  $p < 0,001$ ; ANI vs BDNF-ANI  $t_{(50)} = 4,964$ ,  $p < 0,001$ ; ZIP vs BDNF-VEH  $t_{(50)} = 4,387$ ,  $p < 0,001$ ; ZIP vs BDNF-ANI  $t_{(50)} = 4,549$ ,  $p < 0,001$ ; BDNF-VEH vs BDNF-ZIP  $t_{(50)} = 3,544$ ,  $p < 0,05$ ; BDNF-ANI vs BDNF-ZIP  $t_{(50)} = 3,701$ ,  $p < 0,01$ , ANOVA seguida de teste de múltiplas comparações de Bonferroni), sugerindo que a PKM $\zeta$  de fato atua *downstream* o BDNF durante a reconsolidação da MRO.



**Figura 18. BDNF reverte o efeito amnésico de ANI mas não de ZIP.** Ratos foram treinados na tarefa de RON com dois objetos diferentes (A e B) e 24 h mais tarde foram reativados na presença de um objeto familiar (A) e um objeto desconhecido (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 de VEH, ZIP ou anisomicina (ANI) e suas respectivas co-infusões com BDNF. Um dia depois a retenção da memória foi avaliada em uma sessão de teste com um objeto familiar (A) e um objeto não familiar (D). As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. <sup>#</sup>p < 0.05 em teste-t de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 ou \*p < 0.05 em teste-t de Student ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni; n = 7-9 por grupo.

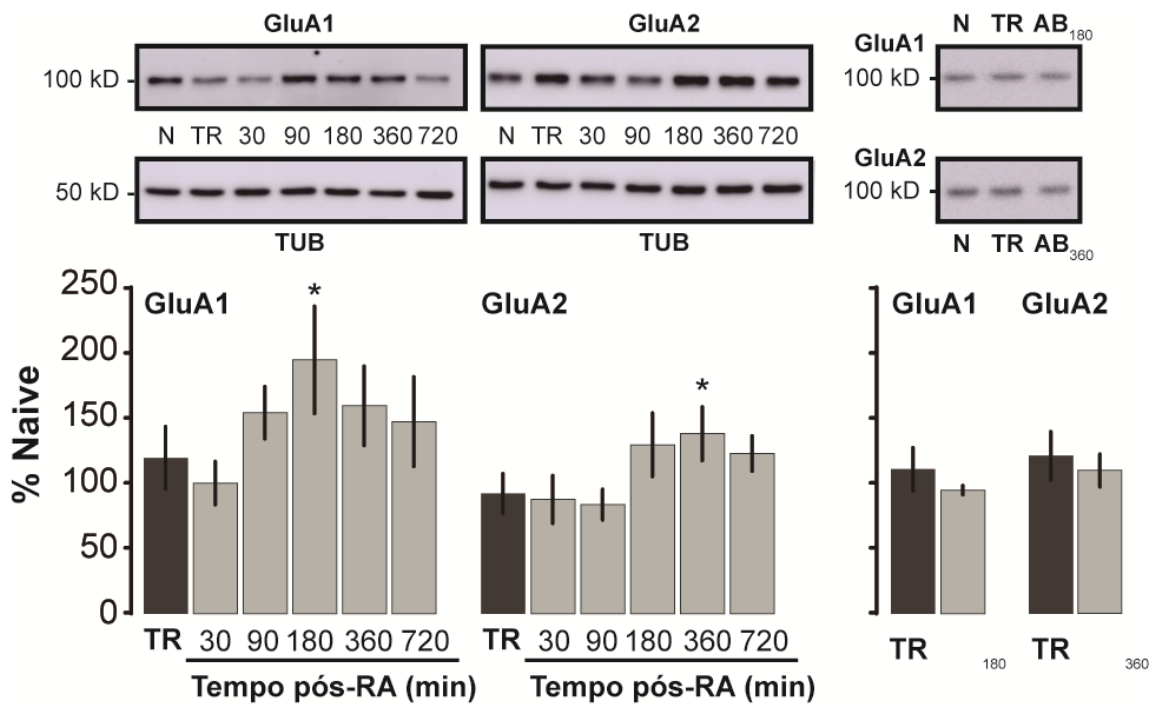
A PKM $\zeta$  mantém a LTP tardia e a persistência de alguns tipos de memória através de um mecanismo que permite a regulação do tráfego sináptico dos AMPAR mediado pela interação entre o fator sensível à N-etilmaleimida (NSF) e a subunidade GluA2 (Ling et al., 2006; Yao et al., 2008; Miguez et al., 2010; 2014). Nós encontramos que Pep2m (5 pmol/lado), um peptídeo que interrompe a interação entre NSF e GluA2 e reduz a expressão dos AMPAR na membrana plasmática (Noel et al., 1999; Ralph et al., 2001; Mattison et al., 2014) resultou amnésico quando administrado na região CA1 do hipocampo dorsal imediatamente após a reativação da MRO na presença de um objeto desconhecido (Figura 19A; sessão de teste com objetos AD:  $t_{(16)} = 3,430$ ,  $p = 0,0034$  vs VEH e com objetos CD  $t_{(20)} = 2,312$ ,  $p = 0,0316$  vs VEH; teste t Student não pareado). Ao contrário, a administração intrahipocampal de dynasore (DYN, 120 pmol/lado), um inibidor da dinamina que impede a internalização dos AMPAR (Macia et al., 2006) e aumenta os níveis de GluA1 e

GluA2 numa fração subcelular enriquecida em PSDs isoladas a partir da região CA1 (Figura 19B; VEH vs DYN  $t_{(2)} = 6,66$ ,  $p = 0,0218$ ; teste t *Student* pareado), reverteu a amnésia causada pelo ZIP (Figura 19C; sessão de teste com objetos AD:  $F_{(3, 37)} = 4,981$ ,  $p = 0,0053$ ; ZIP vs ZIP-DYN  $t_{(37)} = 3,248$ ,  $p < 0,05$ ; ANOVA seguida de teste de múltiplas comparações de Bonferroni), sugerindo que a PKM $\zeta$  também controla a reciclagem sináptica de AMPAR durante a reconsolidação da MRO.



**Figura 19. DYN reverte o efeito amnésico de ZIP. A)** Ratos foram treinados na tarefa de RON com dois objetos diferentes (A e B) e 24 h mais tarde foram reativados na presença de um objeto familiar (A) e um objeto desconhecido (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 de VEH ou PEP2m imediatamente após a sessão de reativação. Um dia depois a retenção da memória foi avaliada em uma sessão de teste com um objeto familiar (A, B ou C) e um objeto novo (D). As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade.  $^{\#}p < 0.05$  em teste-t de *Student* de uma amostragem com média teórica = 0.  $^{***}p < 0.001$ ,  $^{**}p < 0.01$  e  $^{*}p < 0.05$  em teste-t ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 7-11$  por grupo. **B)** Ratos receberam infusões intra-CA1 de VEH no hipocampo direito e DYN no hipocampo esquerdo. Trinta minutos mais tarde os animais foram sacrificados e tiveram a região CA1 do hipocampo dorsal dissecada e homogeneizada para determinação de GluA1 e GluA2 por immunoblotting. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM.  $^{***}p < 0.001$ ,  $^{**}p < 0.01$  ou  $^{*}p < 0.05$  em teste t de *Student* pareado;  $n = 3$  por grupo. **C)** Ratos foram tratados como na Figura A, exceto que receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1  $\mu$ l/lado) de VEH, DYN, ZIP ou ZIP coinfundido com DYN (ZIP+DYN). A retenção da memória foi avaliada em uma sessão de teste realizada 24 horas mais tarde na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (D). Os dados (média  $\pm$  SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade.  $^{\#}p < 0.05$  em teste-t de *Student* de uma amostragem com média teórica = 0.  $^{***}p < 0.001$ ,  $^{**}p < 0.01$  e  $^{*}p < 0.05$  em teste-t ou ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 7-9$  por grupo.

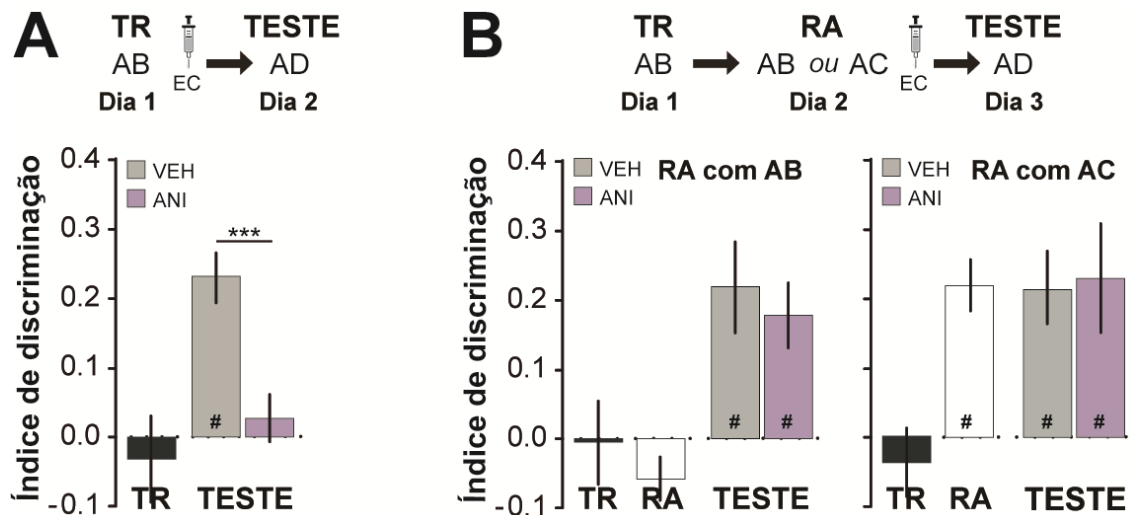
Em concordância com esta ideia, a reativação da MRO na presença de um objeto novo, mas não na presença de dois objetos conhecidos, aumentou a quantidade de GluA1 e GluA2 nas PSDs isoladas a partir da região CA1 do hipocampo dorsal (Figura 20; GluA1:  $F_{(5, 20)} = 4,901$ ,  $p = 0,0043$ ; TRA vs RA180  $t_{(20)} = 3,135$ ,  $p < 0,05$ ; GluA2:  $F_{(5, 15)} = 4,356$ ,  $p = 0,0120$ ; TRA vs RA360  $t_{(15)} = 3,187$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA de medidas repetidas seguida de teste de múltiplas comparações de Bonferroni).



**Figura 20. A reativação da MRO na presença de novidade aumenta a quantidade de GluA1 e GluA na PSD.** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 h pós-treino foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C) (primeiros dois gráficos à esquerda) ou na presença de dois objetos familiares (A e B; gráfico à direita). Em diferentes tempos (30-720 min) após a reativação, os animais foram mortos por decapitação e a região CA1 do hipocampo dorsal dissecada e homogeneizada para determinação por imunoblotting de GluA1 e GluA2. N: animais naives. TR: animais treinados na tarefa do RON. RA: sessão de reativação. Os dados são apresentados como média  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  ou \* $p < 0.05$  em ANOVA seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni;  $n = 4$  por grupo.

A natureza da amnésia induzida pelo bloqueio da reconsolidação tem sido tópico de intenso debate durante as duas últimas décadas (Nader et al, 2000; Sara, 2000; Nader e Einarsson, 2010; Hemstedt et al., 2017; Lee et al., 2017). A discussão centra-se, particularmente, na questão de se o esquecimento induzido deve-se a um déficit permanente no armazenamento do traço mnemônico ou, pelo contrário, representa apenas uma falha profunda, mas transitória, do processo de evocação. Existem evidências contraditórias suportando ambas hipóteses, mas limitações metodológicas e conceituais tem dificultado a resolução desse debate. Interessantemente, a natureza da amnésia provocada pelo ZIP tem promovido disputas semelhantes (Pastalkova et al., 2006; Lisman, 2012; Ren et al., 2013; Jail et al., 2015). Nós hipotetizamos que se o bloqueio da reconsolidação promovido pelo ZIP apaga-se a MRO, então o retreino nessa tarefa deveria iniciar uma repetição do processo original de consolidação, já que os animais teriam que aprender a tarefa novamente e, portanto, um tratamento capaz de bloquear a consolidação deveria impedir a reaquisição da MRO. Pelo contrário, se o efeito amnésico do ZIP se devesse à interrupção do processo de evocação, então o reestabelecimento da MRO não requereria uma nova rodada de consolidação e, portanto, o bloqueio deste processo não teria porque afetar a recuperação da memória. Para avaliar nossa hipótese, aproveitamos o fato de que a consolidação da MRO (Figura 21A Teste: VEH vs ANI:  $t_{(14)} = 3,985$ ,  $p = 0,0014$ , teste t de *Student* não pareado), mas não sua reconsolidação (Figura 21B),

requer da síntese de proteínas no córtex entorrinal (EC) durante um breve período após o treino (Lima et al., 2009).

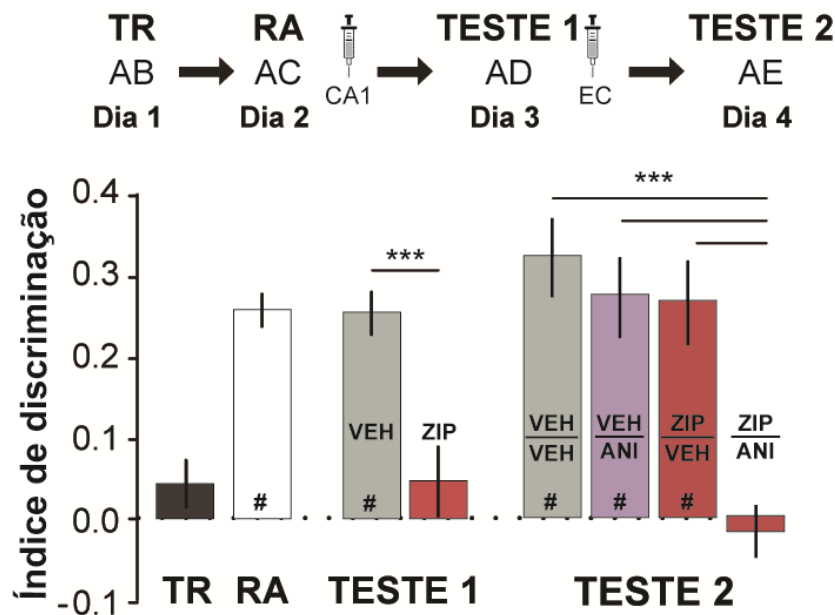


**Figura 21. A consolidação da MRO, mas não sua reconsolidação, necessita de síntese proteica no córtex entorrinal.** **A)** Ratos foram treinados na presença de dois objetos diferentes (A e B) e imediatamente após receberam infusões bilaterais intra-EC (1 µl/lado) de VEH ou ANI. 24 horas mais tarde esses mesmos animais foram testados na presença de um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) para avaliarmos a retenção da MRO. **B)** Ratos foram treinados usando dois objetos diferentes (A e B) e imediatamente após a reativação receberam infusões bilaterais intra-EC (1 µl/lado) de VEH ou ANI. 24 h mais tarde esses mesmos animais foram submetidos a uma sessão teste na presença de um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) para avaliarmos a retenção da MRO. Os dados (média ± SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste-*t* de *Student* de uma

Encontramos que após serem retreinados, os animais que tinham ficado amnésicos como consequência da administração de ZIP após a reativação da MRO readquiriram a memória do objeto A, mas consistente com a ideia de que a inibição da PKM $\zeta$  apaga o traço mnemônico reativado, a administração de ANI no EC após o retreino impediu a reaquisição da MRO, como se esta tivesse tido que ser consolidada novamente (Figura 22; Sessão de teste 1 com objetos AD:  $t(25) = 2,994$ ,  $p = 0,0061$ , teste *t* de *Student* não pareado. Sessão



de teste 2 com objetos AE efeito da interação:  $F(1, 31) = 6,673$ ,  $p = 0,0154$ ; VEH-VEH vs ZIP-ANI:  $t_{(31)} = 4,580$ ,  $p < 0,001$ , ZIP-VEH vs ZIP-ANI:  $t_{(31)} = 4,179$ ,  $p < 0,001$ ; VEH-ANI vs ZIP-ANI:  $t_{(31)} = 4,538$ ,  $p < 0,001$ , ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni).



**Figura 22. A infusão intra hipocampal de ZIP apaga a memória reativada em presença de novidade.** Ratos foram treinados na tarefa de RON usando dois objetos diferentes (A e B) e 24 h após foram submetidos a uma sessão de reativação da MRO na presença de um objeto familiar (A) e um objeto novo (C). Imediatamente após a reativação, os animais receberam infusões bilaterais intra-CA1 (1 µl/lado) de veículo (VEH) ou ZIP. Um dia mais tarde, os animais foram expostos a um objeto familiar (A) e a um objeto novo (D) para avaliarmos a retenção da MRO (TESTE 1) e, imediatamente ao final do teste, os animais receberam infusões bilaterais de VEH ou ANI no córtex entorrinal (EC). Um dia mais tarde esses animais foram testados novamente quanto à retenção da MRO na presença de um objeto familiar (A) e um desconhecido (E), TESTE 2. Os dados (média ± SEM) são apresentados como índice de discriminação. As linhas pontilhadas marcam os níveis de casualidade. # $p < 0.05$  em teste t de Student de uma amostragem com média teórica = 0. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  e \* $p < 0.05$  em teste t de Student ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni ;  $n = 7-9$  por grupo.

#### 4. Discussão

Previamente, nosso laboratório demonstrou que a reativação da memória de reconhecimento em presença de um novo objeto desestabiliza o traço mnemônico e, para persistir, o mesmo deve passar por um processo dependente de expressão gênica e síntese *de novo* de proteínas denominado reconsolidação. Mostramos também que este processo induz LTP e envolve o fortalecimento da eficácia sináptica mediada pela sinalização de BDNF no hipocampo (Rossato et al., 2007; Clarke et al., 2010; Radiske et al., 2015). No presente trabalho, demonstramos que a consolidação da memória de reconhecimento de objetos é imune à inibição da atividade da PKM $\zeta$  no hipocampo. No entanto, quando essa memória é reativada na presença de novidade, ela torna-se sensível ao tratamento com ZIP e à administração de oligonucleótidos antisentido para PKM $\zeta$  no hipocampo, sugerindo que esta quinase é necessária para atualizar a memória de reconhecimento através da reconsolidação, mas não para sua consolidação ou manutenção do traço mnemônico quando este se encontra inativo. Também, apresentamos dados que sugerem que a PKM $\zeta$  hipocampal atua *downstream* ao BDNF para controlar a reciclagem dos receptores AMPA durante a reconsolidação da memória de reconhecimento de objetos, e que o bloqueio desse processo com o ZIP apaga o traço de reconhecimento reativado.

A maioria dos trabalhos que descrevem o envolvimento da PKM $\zeta$  na cognição e plasticidade baseiam-se no uso de ZIP em altas concentrações que 1) prejudicam a LTP e a MLD mesmo em camundongos *knockout* para PKM $\zeta$ , 2)

suprimem a atividade cerebral em ratos anestesiados, e 3) impedem a atividade de outras quinases envolvidas no processamento da memória, tais como a CaMKII e a PKC $\alpha/\lambda$ . Para evitar possíveis efeitos inespecíficos, nós usamos uma dose efetiva de ZIP dez vezes menor do que a tipicamente utilizada para estudar o papel da PKM $\zeta$  no armazenamento da memória. Realizando uma série de experimentos controles, mostramos conclusivamente que o efeito amnésico do ZIP não é devido ao mau funcionamento do hipocampo, ou à alteração da atividade oscilatória espontânea ou à inibição da atividade da CaMKII ou da PKC $\alpha/\lambda$ .

Nossa hipótese de que a atividade da PKM $\zeta$  é essencial para a reconsolidação da memória de reconhecimento é suportada por uma série de resultados que mostram que o efeito amnésico de ZIP 1) ocorre apenas quando a reativação da memória acontece na presença de novidade, 2) demora tempo para revelar-se (confirmando que é um processo), 3) foi tempo-dependente, 4) foi específico para o objeto familiar apresentado durante a sessão de reativação, 5) não foi observado quando a evocação da memória de reconhecimento foi bloqueado pela previa administração de muscimol, e 6) foi mimetizado pela administração de oligonucleótidos antisentido para PKM $\zeta$ . Além disso, a evocação da memória de reconhecimento na presença de um objeto familiar e um objeto desconhecido, mas não na presença de dois objetos familiares, induziu um aumento evidente dos níveis de PKM $\zeta$  na região CA1 do hipocampo dorsal.

Previamente mostramos que a sinalização mediada pelo BDNF regula a reconsolidação da memória de reconhecimento e que a administração dessa

neurotrofina reverte o efeito amnésico produzido por inibidores da expressão gênica ou da síntese de proteínas no hipocampo (Radiske et al., 2017). Sabe-se também que o BDNF controla a síntese e a reciclagem da PKM $\zeta$  (Kelly et al., 2007) permitindo que esta quinase mantenha a LTP no hipocampo, mesmo na presença de inibidores síntese proteica (Mei et al., 2011), mediante a regulação do tráfego dos receptores AMPA dependente do fator sensível à N-etilmaleimida (NSF)/GluA2 para a sinapse (Ling et al., 2006). O efeito amnésico do ZIP tem sido relacionado ao envolvimento da PKM $\zeta$  na reciclagem dos receptores AMPA durante potenciação sináptica, motivo pelo qual esse processo foi estudado principalmente durante a aquisição e o esquecimento da memória (Hardt et al., 2013; Miguez et al., 2016). No entanto, a reciclagem dos receptores AMPA também é promovida pela evocação da memória (Rössner et al., 2017) e a reconsolidação da memória de reconhecimento induz LTP no hipocampo (Clarke et al., 2010), a qual é necessária na amígdala para a reconsolidação de memórias não declarativas motivadas pelo medo (Hong et al., 2013).

Uma das perguntas que a neurobiologia da memória ainda não conseguiu responder é se a amnésia observada após a administração de inibidores da reconsolidação se deve ao apagamento permanente do traço mnemônico ou a uma falha na evocação. Existem diversas evidências apoiando ambas hipóteses, mas restrições metodológicas e conceituais dificultaram a resolução desse debate. Em relação a isso, a natureza da amnésia causada pela inibição da PKM $\zeta$  levantou uma questão similar (Nader, 2011; Parsons e Davis, 2011).

Nós hipotetizamos que se o bloqueio da reconsolidação com ZIP apagou o traço da memória reativada, uma sessão de retreinamento deveria iniciar o processo de consolidação original, pois os animais deveriam aprender a tarefa novamente. Nessa condição, tratamentos capazes de bloquear a consolidação deveriam também impedir a reaquisição da memória de reconhecimento. Por outro lado, se o efeito amnésico do ZIP se devesse a uma falha causada na evocação, a reinstalação da memória de reconhecimento após uma sessão de retreinamento não recapitularia o processo de consolidação. Nesse caso, o bloqueio da consolidação não deveria afetar a recuperação da memória. Como a inibição da síntese proteica no córtex entorrinal prejudica a consolidação, mas não a reconsolidação da memória de reconhecimento, o resultado que mostra que a infusão de ANI nessa região cortical após a sessão de treino impediu o reaprendizado da tarefa em animais amnésicos tratados previamente com ZIP sugere fortemente que esse tratamento eliminou o traço da memória de reconhecimento. Acreditamos que este resultado é de extrema relevância, na medida em que a hipótese de que a falha da evocação está em desacordo não somente com a ideia predominante de que a reconsolidação serve para permitir a atualização da memória de longa duração durante a evocação (Lee et al., 2018), mas também não concorda com a ideia de que a ativação da PKM $\zeta$  é suficiente para sustentar o armazenamento da memória de longa duração (Sacktor, 2012).

Nossos dados confirmam que a PKM $\zeta$  hipocampal desempenha um papel relevante no processamento de memória e apoia a hipótese de que a inibição

dessa quinase apaga a memória de longa duração, mas são inconsistentes com a ideia de que a principal função da PKM $\zeta$  é manter a memória ao longo do tempo. De fato, nossos achados sugerem que a PKM $\zeta$  controla a persistência da memória de reconhecimento de objetos reativada sob condições que induzem a reconsolidação, mas não de traços consolidados inativos ou daqueles ainda não consolidados. Isto está de acordo com trabalhos mostrando que alguns tipos de memória não são suscetíveis à inibição da PKM $\zeta$  no momento ou logo após o treinamento (Serrano et al., 2008) e também com a observação anterior de que o armazenamento da memória de reconhecimento é resistente à administração tardia de ZIP na região CA1 do hipocampo dorsal após o treinamento (Migues et al., 2010). No entanto, diferente do nosso protocolo, o paradigma de aprendizagem empregado por Migues e colaboradores envolveu a exploração de dois objetos idênticos e os autores atribuíram a falta de efeito do ZIP ao fato de que a memória de reconhecimento reside fora do hipocampo dorsal, o que é um equívoco (Squire et al., 2007; Farovik et al., 2009; Clarke et al., 2010; Wixted e Squire, 2011; Cohen et al., 2013; Beer et al., 2013; Stackman Jr. et al., 2016).

## 5. Conclusões

Nossos resultados demonstram que a MRO é imune a inibição da PKM $\zeta$  hipocampal imediatamente 1 ou 7 dias depois do treino, mas torna-se sensível à ação do ZIP e de oligonucleotídeos antisentido contra a PKM $\zeta$  após sua reativação na presença de um objeto novo, o qual sugere que esta quinase é necessária para atualizar a memória de reconhecimento mediante um processo reconsolidatório, mas não para consolidar e manter o armazenamento do traço inativo. Nosso trabalho também demonstra que a PKM $\zeta$  atua *downstream* o BDNF para controlar a reciclagem dos AMPAR hipocampais durante a reconsolidação e que ZIP de fato apaga o traço mnemônico reativado.

## 6. Referências

Alberini CM, LeDoux JE. Memory reconsolidation. *Current Biology*

Adasme T, Haeger P, Paula-Lima AC, Espinoza I, Casas-Alarcón MM, Carrasco MA, Hidalgo C. Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:3029-3034, 2011

Bailey CH, Kandel ER, and Si, K. The Persistence of Long-Term Memory: A Molecular Approach to Self-Sustaining: Changes in Learning-Induced Synaptic Growth. *Neuron*, 44, 49–57, 2004

Bal NV, Susorov D, Chesnokova E, Kasianov A, Mikhailova T, Alkalaeva E, Balaban PM, Kolosov P. Upstream Open Reading Frames Located in the Leader of Protein Kinase Mζ mRNA Regulate Its Translation. *Front Mol Neurosci.* 9:103, 2016

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience: Exploring the Brain*. 4<sup>th</sup> edition, 2015



Beer Z, Chwiesko C, Kitsukawa T, Sauvage MM. Spatial and stimulus-type tuning in the LEC, MEC, POR, PrC, CA1, and CA3 during spontaneous item recognition memory. *Hippocampus*. 23:1425–1438, 2013

Bhattacharya S, Mukherjee B, Doré JJE, Yuan Q, Harley CW, McLean JH. Histone deacetylase inhibition induces odor preference memory extension and maintains enhanced AMPA receptor expression in the rat pup model. *Learn Mem*. 24:543-551. 2017

Bures J., Fenton A.A., Kaminsky Y., Zinyuk L. Place cells and place navigation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 94:343–350, 1997

Bush AL, Allen PA, Kaut KP, Ogrocki PK. Influence of mild cognitive impairment on visual word recognition. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn*. 14:329-352, 2007

Cai D, Pearce K, Chen S, Glanzman DL. Protein kinase M maintains long-term sensitization and long-term facilitation in aplysia. *J Neurosci*. 31(17):6421-31. 2011

Caldeira MV, Melo CV, Pereira DB, Carvalho R, Correia SS, Backos DS, Carvalho AL, Esteban JA, Duarte CB. Brain-derived neurotrophic factor regulates the expression and synaptic delivery of alpha-amino-3-hydroxy-5-

methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits in hippocampal neurons. J Biol Chem. 282:12619-12628, 2007

Changchi Hsieh, Panayiotis Tsokas, Peter Serrano, Iván Hernández, Dezhi Tian, James E. Cottrell, Harel Z. Shouval, André Antonio Fenton, e Todd Charlton Sacktor Persistent increased PKM $\zeta$  in long-term and remote spatial memory. Neurobiology of learning and memory. 2017

Clarke JR, Cammarota M, Gruart A, Izquierdo I, Delgado-García JM. Plastic modifications induced by object recognition memory processing. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:2652-2657, 2010

Cohen SJ, Stackman RW Jr. Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. Behav Brain Res. 285:105-17. 2015

Crespo JA<sup>1</sup>, Stöckl P, Ueberall F, Jenny M, Saria A, Zernig G. Activation of PKC $\zeta$  and PKM $\zeta$  in the nucleus accumbens core is necessary for the retrieval, consolidation and reconsolidation of drug memory. PLoS One. 2:e30502, 2012

Crick F. Memory and molecular turnover. Nature. 312:101, 1984

de Hoz L, Martin SJ, Morris RG. Forgetting, reminding, and remembering: the retrieval of lost spatial memory. *PLoS Biol.* 2:E225. 2004

DeVito LM, Eichenbaum H. Distinct contributions of the hippocampus and medial prefrontal cortex to the "what-where-when" components of episodic-like memory in mice. *Behav Brain Res.* 215:318-25. 2010

Drier, E.A., Tello, M.K., Cowan, M., Wu, P., Blace, N., Sacktor, T.C., Yin, J.C.P. Memory enhancement and formation by atypical PKM activity in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Neurosci.* 5: 316-324. 2002

Dudai Y. *Memory from A to Z: keywords, concepts, and beyond.* 1<sup>st</sup> edition, 2002.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res.* 31:47-59, 1988

Farovik A, Dupont LM, Arce M, Eichenbaum H. Medial prefrontal cortex supports recollection, but not familiarity, in the rat. *J Neurosci* 28: 13428–13434, 2009

Fellgiebel A, Schermuly I, Gerhard A, Keller I, Albrecht J, Weibrich C, Müller MJ, Stoeter P. Functional relevant loss of long association fibre tracts integrity in early Alzheimer's disease. *Neuropsychologia*. 46:1698-1706, 2008

Fukunaga K, Miyamoto E. A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. *Neurosci Res*. 38:3-17, 2000

Hardt O, Nader K, Nadel L. Decay happens: the role of active forgetting in memory. *Trends Cogn Sci*. 17(3):111-20, 2013

Hemstedt TJ, Lattal KM, Wood MA. Reconsolidation and extinction: Using epigenetic signatures to challenge conventional wisdom. *Neurobiol Learn Mem*. 142:55-65, 2017.

Hernandez AI, Blace N, Crary JF, Serrano PA, Leitges M, Libien JM, Weinstein G, Tcherapanov A, Sacktor TC. Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory. *J Biol Chem*. 278:40305-40316, 2003

Hernández AI, Oxberry WC, Crary JF, Mirra SS, Sacktor TC. Cellular and subcellular localization of PKM $\zeta$ . *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 369:20130140, 2013

Hsieh C, Tsokas P, Serrano P, Hernández AI, Tian D, Cottrell JE, Shouval HZ, Fenton AA, Sacktor TC. Persistent increased PKM $\zeta$  in long-term and remote spatial memory. *Neurobiol Learn Mem.* 138:135-144. 2017

Hu J, Adler K, Farah CA, Hastings MH, Sossin WS, Schacher S. Cell-Specific PKM Isoforms Contribute to the Maintenance of Different Forms of Persistent Long-Term Synaptic Plasticity. *J Neurosci.* 37:2746-2763, 2017

Jalil SJ, Sacktor TC, Shouval HZ. Atypical PKCs in memory maintenance: the roles of feedback and redundancy. *Learn Mem.* 22:344-353, 2015

Jourdi H, Kabbaj M. Acute BDNF treatment upregulates GluR1-SAP97 and GluR2-GRIP1 interactions: implications for sustained AMPA receptor expression. *PLoS One.* 8:e57124, 2013

Kelly MT, Crary JF, Sacktor TC. Regulation of protein kinase Mzeta synthesis by multiple kinases in long-term potentiation. *J Neurosci.* 27:3439-3444, 2007

Kwapis JL, Helmstetter FJ. Does PKM(zeta) maintain memory? *Brain Res Bull.* 105:36-45, 2014

LeBlancq MJ, McKinney TL, Dickson CT. ZIP It: Neural Silencing Is an Additional Effect of the PKM-Zeta Inhibitor Zeta-Inhibitory Peptide. *J Neurosci.* 36:6193-6198, 2016

Lee AM, Kanter BR , Wang D , Lim JP, Zou ME, Qiu C, McMahon T, Dadgar J, Fischbach-Weis SC, Messing RO. *Prkcz* null mice show normal learning and memory. *Nature.* 493:416-419, 2013

Lee JLC, Nader K, Schiller D. An Update on Memory Reconsolidation Updating. *Trends Cogn Sci.* 21(7):531-545, 2017

Levitan D, Fortis-Santiago Y, Figueroa JA, Reid EE, Yoshida T, Barry NC, Russo A, Katz DB. Memory Retrieval Has a Dynamic Influence on the Maintenance Mechanisms That Are Sensitive to  $\zeta$ -Inhibitory Peptide (ZIP). *J Neurosci.* 36:10654-10662, 2016

Li X, Wolf ME. Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases AMPA receptor surface expression in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.* 34:190-198, 2011

Ling DS, Benardo LS, Sacktor TC. Protein kinase Mzeta enhances excitatory synaptic transmission by increasing the number of active postsynaptic AMPA receptors. *Hippocampus.* 16:443-52, 2006

Lisman J. Memory erasure by very high concentrations of ZIP may not be due to PKM-zeta. *Hippocampus*. 22:648-649, 2012

Lisman JE, McIntyre CC. Synaptic plasticity: a molecular memory switch. *Curr Biol*. 11:R788-791, 2001

Lisman J, Yasuda R, Raghavachari S. Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation Abstract | Long-term potentiation (LTP) of synaptic strength occurs. *Nature Reviews Neuroscience*. 13:169-182, 2012

Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell*. 10:839-50, 2006

Mattison HA, Bagal AA, Mohammadi M, Pulimood NS, Reich CG, Alger BE, Kao JP, Thompson SM. Evidence of calcium-permeable AMPA receptors in dendritic spines of CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 112:263-275, 2014

Mei F, Nagappan G, Ke Y, Sacktor TC, Lu B. BDNF facilitates L-LTP maintenance in the absence of protein synthesis through PKM $\zeta$ . *PLoS One*. 6:e21568, 2011

Migues PV, Hardt O, Wu DC, Gamache K, Sacktor TC, Wang YT, Nader K. PKMzeta maintains memories by regulating GluR2-dependent AMPA receptor trafficking. *Nat Neurosci.* 13:630-4. 2010

Mineka S. The role of fear in theories of avoidance learning, flooding and extinction. *Psychol Bull.* 86:985–1010, 1979

Migues PV, Hardt O, Finnie P, Wang YW, Nader K. The maintenance of long-term memory in the hippocampus depends on the interaction between N-ethylmaleimide-sensitive factor and GluA2. *Hippocampus.* 24(9):1112-9 2014

Myskiw JC, Rossato JI, Bevilaqua LR, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 89:338-351, 2008

Nader K, Hardt O. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci.* 10(3):224-34, 2009

Nader K, Schafe GE, LeDoux JE. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci.* 1(3):216-9, 2000

Nader K, Einarsson EO. Memory reconsolidation: an update. *Ann N Y Acad Sci.* 1191:27-41, 2010



Noel J, Ralph GS, Pickard L, Williams J, Molnar E, Uney JB, Collingridge GL, Henley JM. Surface expression of AMPA receptors in hippocampal neurons is regulated by an NSF-dependent mechanism. *Neuron*. 23:365-376, 1999

O'Bryant SE, Hobson V, Hall JR, Waring SC, Chan W, Massman P, Lacritz L, Cullum C, Munro Diaz-Arrastia, R. Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*. 17:337-341, 2009

Overmier JB, Brackbill RM. On the independence of stimulus evocation of fear and fear evocation of responses. *Behav Res Ther*. 15:51–56, 1977

Parsons RG, Davis M. Temporary disruption of fear-potentiated startle following PKMzeta inhibition in the amygdala. *Nat. Neurosci*. 14:295–6, 2011a

Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*. 313:1141-1144, 2006

Paxinos G & Watson C. The rat brain in the stereotaxic. 2<sup>nd</sup> edition.

Paxinos, George, and Charles Watson. The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Access Online via Elsevier (A tool by Matt Gaidica), 2006.

Przybylski J1, Sara SJ. Reconsolidation of memory after its reactivation. Behav Brain Res. 1997

Ralph GS, Bienemann A, Ma J, Tan HK, Noel J, Henley JM, Uney JB. Disruption of the GluR2-NSF interaction protects primary hippocampal neurons from ischemic stress. Mol Cell Neurosci. 17:662-670, 2001

Rao-Ruiz P, Rotaru DC, van der Loo RJ, Mansvelder HD, Stiedl O, Smit AB, Spijker S. Retrieval-specific endocytosis of GluA2-AMPA receptors underlies adaptive reconsolidation of contextual fear. Nat Neurosci. 14:1302-8. 2011

Redish AD, Touretzky DS. The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. Neural Comput. 10:73-111. 1998

Reimers JM, Loweth JA, Wolf ME. BDNF contributes to both rapid and homeostatic alterations in AMPA receptor surface expression in nucleus accumbens medium spiny neurons. Eur J Neurosci. 39:1159-1169, 2014

Ren SQ, Yan JZ, Zhang XY, Bu YF, Pan WW, Yao W, Tian T, Lu W. PKC $\alpha$  is critical in AMPA receptor phosphorylation and synaptic incorporation during LTP. EMBO J. 32:1365-1380, 2013

Riccio DC, Silvestri R. Extinction of avoidance behavior and the problem of residual fear. *Behav Res Ther* 11:1–9, 1973

Rossato JI, Bevilaqua LR, Myskiw JC, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.* 14:36-46, 2007

Sacktor TC. PKMzeta, LTP maintenance, and the dynamic molecular biology of memory storage. *Prog Brain Res.* 169:27-40. 2008

Sacktor TC, Hell JW. The genetics of PKM $\zeta$  and memory maintenance. *Sci Signal.* 14;10. 2017

Sajikumar S, Korte M. Metaplasticity governs compartmentalization of synaptic tagging and capture through brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and protein kinase Mzeta (PKMzeta). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:2551-6. 2011

Sara SJ. Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learn Mem.* 2:73-84, 2000

Schimanski LA, Nguyen PV. Multidisciplinary approaches for investigating the mechanisms of hippocampus-dependent memory: a focus on inbred mouse strains. *Neurosci Biobehav.* 28:463-83, 2004

Schuetz SR, Fernández-Fernández D, Lamla T, Rosenbrock H, Hobson S. Overexpression of Protein Kinase M $\zeta$  in the Hippocampus Enhances Long-Term Potentiation and Long-Term Contextual But Not Cued Fear Memory in Rats. *J Neurosci*. 36:4313-24. 2016

Shema R, Sacktor TC, Dudai Y. Rapid erasure of long-term memory associations in the cortex by an inhibitor of PKM zeta. *Science*. 317:951-3. 2007

Shema R, Haramati S, Ron S, Hazvi S, Chen A, Sacktor TC, Dudai Y. Enhancement of consolidated long-term memory by overexpression of protein kinase Mzeta in the neocortex. *Science*. 6021:1207-10, 2011

Stackman RW Jr, Cohen SJ, Lora JC, Rios LM. Temporary inactivation reveals that the CA1 region of the mouse dorsal hippocampus plays an equivalent role in the retrieval of long-term object memory and spatial memory. *Neurobiol Learn Mem*. 2016

Sweatt JD. Mechanism of memory. 2<sup>nd</sup> edition, 2010

Tsokas P, Hsieh C, Yao Y, Lesburguères E, Wallace EJC, Tcherepanov A, Jothianandan D, Hartley BR, Pan L, Rivard B, Farese RV, Sajan MP, Bergold PJ, Hernández AI, Cottrell JE, Shouval HZ, Fenton AA, Sacktor TC.

Compensation for PKM $\zeta$  in long-term potentiation and spatial long-term memory in mutant mice. *Elife*. 17: 14846, 2016

Vanyushin BF, Tushmalova NA, Guskova LV, Demidkina NP, Nikandrova LR. The DNA methylation levels change in the rat brain on conditioned reflex elaboration. *Molecular Biology (Moscow)*. 11:181-87, 1977

Volk LJ, Bachman JL, Johnson R, Yu Y, Huganir RL. PKM- $\zeta$  is not required for hippocampal synaptic plasticity, learning and memory. *Nature*. 493:420-423, 2013

Wang S, Sheng T, Ren S, Tian T, Lu W. Distinct Roles of PKC $\alpha/\lambda$  and PKM $\zeta$  in the Initiation and Maintenance of Hippocampal Long-Term Potentiation and Memory. *Cell Rep*. 16:1954-1961, 2016

Wixted JT, Squire LR. The familiarity/recollection distinction does not illuminate medial temporal lobe function: response to Montaldi and Mayes. *Trends Cogn Sci*. 2011

Wu-Zhang AX, Schramm CL, Nabavi S, Malinow R, Newton AC. Cellular pharmacology of protein kinase M $\zeta$  (PKM $\zeta$ ) contrasts with its in vitro profile:

implications for PKM $\zeta$  as a mediator of memory. J Biol Chem. 287:12879-85, 2012

Yao Y, Shao C, Jothianandan D, Tcherepanov A, Shouval H, Sacktor TC. Matching biochemical and functional efficacies confirm ZIP as a potent competitive inhibitor of PKM $\zeta$  in neurons. Neuropharmacology. 64:37-44, 2013

Zhang YH, Kays J, Hodgdon KE, Sacktor TC, Nicol GD. Nerve growth factor enhances the excitability of rat sensory neurons through activation of the atypical protein kinase C isoform, PKM $\zeta$ . J Neurophysiol. 2012 Jan;107(1):315-35